

# 有用物質高生産性麹菌の造成を目指したカーボントアボライト抑制関連因子の機能解析

著者	一瀬 桜子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18173号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00122670">http://hdl.handle.net/10097/00122670</a>

博士論文

有用物質高生産性麹菌の造成を目指した  
カーボンカタボライト抑制関連因子の機能  
解析

東北大学大学院農学研究科  
生物産業創成科学専攻

一瀬 桜子

指導教員 五味 勝也 教授



## 目次

### 序章

0-1 序論 .....	1
0-2 実験材料及び実験方法 .....	7

### 第1章 カーボンカタボライト抑制関連因子 CreA 及び CreB の制御による有用物質高生産

1-1 緒言 .....	17
1-2 実験方法 .....	18
1-3 実験結果 .....	24
1-3-1 高濃度マルトース条件下における $\alpha$ -アミラーゼ生産性	
1-3-2 高濃度グルコース及びデンプン培地における $\alpha$ -アミラーゼ生産性	
1-3-3 バイオマス分解酵素生産培地における生育	
1-3-4 キシロース資化関連遺伝子の転写制御因子 XlnR の発現解析	
1-3-5 キシラナーゼ生産性	
1-3-6 $\beta$ -グルコシダーゼ及びセルラーゼ生産性	
1-3-7 小麦フスマを用いた固体培養における酵素生産性	
1-4 考察 .....	27
1-5 図表 .....	31

### 第2章 カーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による液体培養時の菌糸形態の制御

2-1 緒言 .....	37
2-2 実験方法 .....	38
2-3 実験結果 .....	41
2-3-1 <i>creA</i> 破壊による液体培養時の生育への影響	
2-3-2 液体培養時の菌糸形態の観察	
2-3-3 薬剤感受性試験	

2-3-4	細胞壁構成多糖の成分解析	
2-3-5	$\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の発現解析	
2-3-6	細胞壁構成多糖の合成に関与する遺伝子の発現解析	
2-3-7	$\alpha$ -グルカンの合成及び分解に関与する遺伝子クラスターの発現解析	
2-3-8	<i>amyD</i> 遺伝子の破壊株及び高発現株の作製	
2-3-9	<i>amyD</i> 遺伝子の破壊株及び高発現株の液体培養時の菌糸形態の観察	
2-3-10	<i>amyD</i> 破壊株及び高発現株の薬性感受性試験	
2-3-11	<i>amyD</i> 遺伝子の破壊株及び高発現株の細胞壁構成多糖の成分解析	
2-3-12	$\alpha$ -グルカンの分子量解析	
2-4	考察	45
2-5	図表	49

### 第3章 カーボンカタボライト抑制転写因子 CreA の有機酸生産への関与

3-1	緒言	62
3-2	実験方法	62
3-3	実験結果	67
3-3-1	0.1% ポリペプトンを窒素源とした最小培地における $\alpha$ -アミラーゼ生産性	
3-3-2	生育比較及び $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 <i>amyB</i> の発現解析	
3-3-3	培養上清の pH の測定	
3-3-4	培養上清中の有機酸の定量	
3-3-5	マイクロアレイ解析による網羅的な転写解析	
3-3-6	Phosphoenolpyruvate carboxykinase <i>AcuF</i> の遺伝子破壊株の作製及び培養上清の pH の測定	
3-3-7	窒素源の違いによる pH の変化	
3-3-8	アミノ酸の違いによる pH の変化	
3-4	考察	71
3-5	図表	74

総合考察 .....	83
参考文献 .....	86
謝辞 .....	95



## 序章

### 0-1) 序論

糸状菌は発酵食品や医薬品などの製造に長年用いられてきた産業微生物であり、各々の特長を活かして幅広い産業に利用されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、デンプン分解酵素であるアミラーゼを菌体外に多量に分泌生産するという特長を活かして、古来より清酒や味噌などの発酵食品の製造に用いられており、世界的にも安全性の高さが認められている微生物である (Barbesgard *et al.*, 1992)。近年では、遺伝子操作技術が急速に発展したことで麹菌の全ゲノム解析も終了し、得られたゲノム情報を活用して麹菌が生産する産業上有用な酵素の高生産化が試みられている (Machida *et al.*, 2005)。

さらに、麹菌はその安全性の高さとタンパク質の分泌能力の高さを活かして、異種タンパク質生産の宿主としての利用も期待されており、これまでに麹菌を用いて異種タンパク質を高生産させるために様々な戦略が立てられてきた (Hoang *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2014)。その戦略の一つが、異種遺伝子を高発現させるための高発現プロモーターの開発である。麹菌はアミラーゼ系酵素遺伝子の発現量が非常に高いことから、異種遺伝子の高発現用プロモーターとしてアミラーゼ系酵素の一種である $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* のプロモーターが利用された (Tsuchiya *et al.*, 1992)。*amyB* に加えてグルコアミラーゼ遺伝子 *glaA* 及び $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子 *agdA* などのアミラーゼ系酵素遺伝子は  $Zn_2Cys_6$  型転写因子 AmyR によって制御されることが知られており、AmyR はアミラーゼ生産の誘導基質であるマルトースやデンプンが存在すると制御下遺伝子の発現を誘導し、アミラーゼ生産を活性化させる (Gomi *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2015)。さらに、*amyB*、*glaA* 及び *agdA* のプロモーター解析の結果、AmyR のシスエレメントである Region III が同定され、この Region III をタンデムに複数個導入した改良型高発現プロモーターも開発された (Minetoki *et al.*, 1998; Kanemori *et al.*, 1999)。

しかし、高発現用プロモーターとしてアミラーゼ系酵素遺伝子のプロモーターを利用するには問題点もあった。麹菌のアミラーゼ系酵素遺伝子はデンプンなどの誘導基質が存在すると発現が誘導されるものの、ここにグルコースが添加されるとその発現は一転して抑制される (Gomi *et al.* 2000; Tada *et al.* 1989; Tonomura *et al.* 1961)。このグルコースによって誘導されるアミラーゼ遺伝子の発現抑制は、カーボンカタボライト抑制

(CCR) 機構によって制御されており、麴菌をマルトースとグルコースの混合培地で培養すると、マルトースを単一炭素源とした培地と比較して *amyB* は CCR を受けることで発現が著しく抑制され、 $\alpha$ -アミラーゼ生産性も低下することが観察された (Fig. 0-1)。そのため、麴菌を用いて産業上有用な酵素や異種タンパク質を高生産させるには、CCR が解除された麴菌株の造成が必要とされている。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における CCR は、転写因子 Mig1 によって制御されることが知られている (Trumbly, 1992)。Mig1 はリン酸化及び脱リン酸化によって制御されており、グルコース存在条件下において Mig 1 は Reg1-Glc7 によって脱リン酸化されることで核へ移行し、グルコースに応答した遺伝子の発現抑制を行う。一方、グルコース非存在条件下では Snf1 によって Mig1 はリン酸化されることで核から細胞質へ移行し、遺伝子の発現を脱抑制する (DeVit *et al.*, 1997, 1999)。

一方モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* における CCR は、 $C_2H_2$  型転写因子 CreA によって制御されており、さらに CreA 以外の CCR 関連因子として CreB、CreC 及び CreD が同定されている (Dowzer and Kelly., 1991; Kato *et al.*, 1996; Hynes and Kelly., 1977; Kelly and Hynes., 1977)。CreA は酵母とは異なりユビキチン化・脱ユビキチン化によって制御されることが考えられており、グルコース存在条件下では脱ユビキチン化酵素 CreB 及び WD40 リピードタンパク質 CreC の複合体によって CreA は脱ユビキチン化され、グルコース非存在条件下ではアレクチン様タンパク質 CreD とユビキチンリガーゼ HulA によってユビキチン化されると予想されている (Lockington and Kelly., 2001, 2002; Natasha *et al.*, 2004)。

これまでに我々は麴菌において *creA* 及び *creB* の単独及び二重破壊株を作製し、CCR への影響を解析した結果、全ての破壊株で CCR が解除されたことから、麴菌においても CreA 及び CreB は CCR 制御に関与していることを明らかにした。さらに CCR が解除されたことによって全ての破壊株で野生株よりも $\alpha$ -アミラーゼ生産性が向上し、特に *creA/creB* 二重破壊株は単独破壊株よりも顕著に高い $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示した (Fig. 0-2)。このことから、麴菌における *creA* 及び *creB* の二重破壊は $\alpha$ -アミラーゼの高生産に非常に効果があることに加え、*creA/creB* 二重破壊株を宿主としてアミラーゼ遺伝子プロモーターを用いて異種遺伝子を高発現させることで、異種タンパク質の高生産も可能になることが期待された。

また、麴菌はアミラーゼ系酵素遺伝子だけではなく、キシラナーゼやセルラーゼなどのセルロース系バイオマス分解酵素遺伝子も多数有しており、*A. nidulans* においてバイオマス分解酵素遺伝子もアミラーゼ系酵素遺伝子と同様に CreA による CCR を受けることが報告されている (Tamayo *et al.*, 2008)。以上のことから、麴菌においても *creA* 及び *creB* 破壊をすることで、 $\alpha$ -アミラーゼに加えてバイオマス分解酵素も高生産できるのではないかと期待される。

さらに *creA* 破壊株の酵素生産性を解析する過程で、液体培地において *creA* 破壊株の菌糸形態が変化するという大変興味深い現象を見出した。麴菌を液体培養すると菌糸が絡まり合いペレット状の菌糸形態を示すのに対し、*creA* 破壊株では菌糸が培地中に分散してパルプ状または小さなペレット状に形態が変化し、菌体量も野生株よりも増加した。糸状菌において *creA* 変異株は寒天培地上では生育が悪化することは知られているものの、液体培養時に菌糸形態が変化して野生株より生育がよくなるという報告はない。これまでに報告されている CreA による制御を受ける遺伝子は、主に多糖類分解酵素遺伝子であり、今回我々が見出したような CreA が菌糸形態の制御に関与する遺伝子の発現制御を行なっているということはほとんど知られていない。さらに、液体培養における麴菌の物質生産性を向上させる工夫として、*creA* 破壊株のように菌糸形態をパルプ状に変化させる方法がある (Miyazawa *et al.*, 2016)。このことから、CreA が液体培養時に菌糸形態をどのように制御しているかを明らかにすることは、CreA による遺伝子発現制御機構の理解を深めると共に、麴菌の物質生産性の向上に繋がる新たな知見を得ることができると思われる。

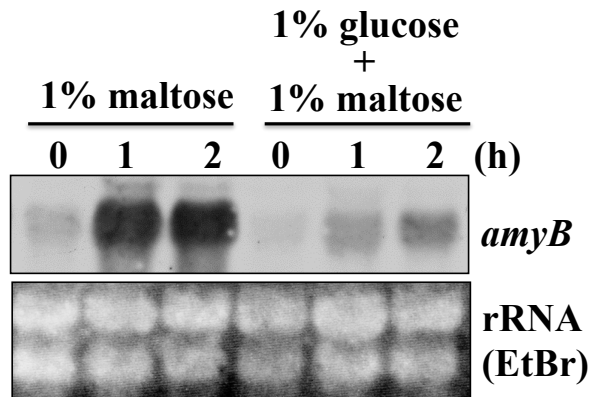
ここまでの結果から、*creA* 破壊は酵素生産性の向上に非常に効果的であると述べてきたが、*creA* 破壊株は培地組成の変化によって $\alpha$ -アミラーゼ活性が野生株よりも顕著に低下する現象も観察された。CreA は多くの遺伝子の発現制御に関与しているため、培地条件によってその制御機構は大きく変化し、酵素生産性に影響を及ぼすのだと予想された。*creA* 破壊株の産業利用を実現するためには、培地の組成に依存せず安定して酵素を高生産することが求められる。そのため、なぜ培地によって *creA* 破壊株の酵素生産性が低下するのかを明らかにすることは、より有用な酵素高生産株の造成につながると思われる。

以上のことから本博士論文では、麴菌における CCR 関連因子である CreA 及び CreB

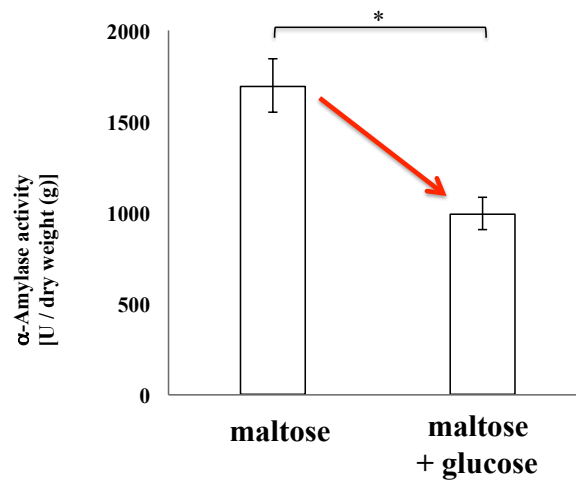
に着目し、第 1 章では様々な培養条件における *creA* 及び *creB* 破壊株の酵素生産性を解析し、これらの遺伝子破壊は麹菌が生産する多様な酵素の高生産化に効果があるか検討した。第 2 章では CreA による液体培養時の菌糸形態の制御メカニズムを解析し、さらに第 3 章では *creA* 破壊株における $\alpha$ -アミラーゼ生産性の低下を引き起こす要因を解析することで、CreA によるグローバルな転写制御機構を明らかにすることを目指した。



(A)



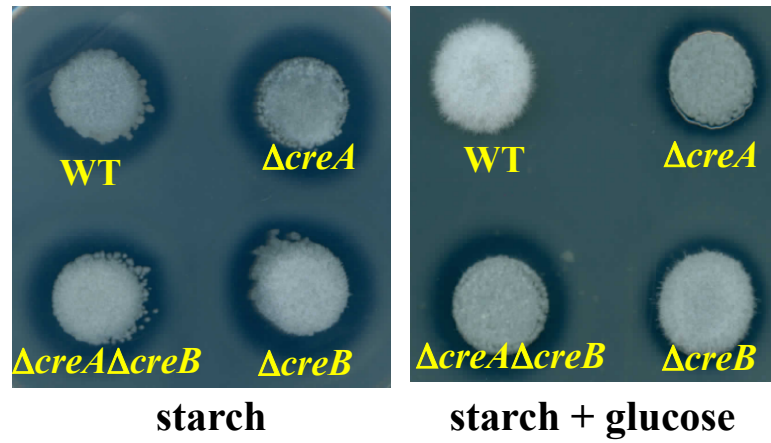
(B)



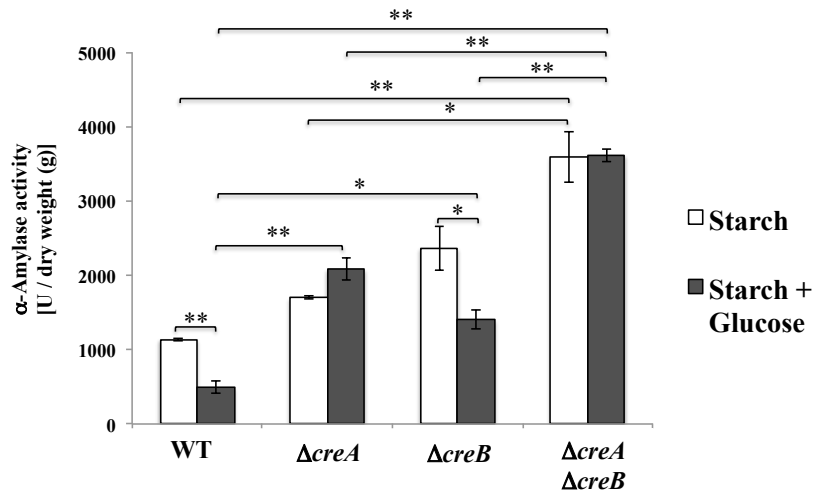
**Fig. 0-1 Glucose-induced repression of  $\alpha$ -amylase production.**

Expression level of  $\alpha$ -amylase gene *amyB* (B) and  $\alpha$ -amylase activity (A) in the presence of glucose. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ ; Student's t test)

(A)



(B)



**Fig. 0-2  $\alpha$ -Amylase production level of  $\Delta creA$ ,  $\Delta creB$  and  $\Delta creA\Delta creB$ .**

Halo assay on starch or starch plus glucose agar plate (A) and  $\alpha$ -amylase activity in liquid YP medium containing 1% starch or 1% starch plus 1% glucose for 48 h (B). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's t test and Tukey-Kramer method)

## 0-2) 実験材料及び実験方法

### 0-2-1) 試薬

試薬は特に表記がない限り和光純薬工業の特級試薬を用いた。試薬を調製する際は、脱塩水、脱塩蒸留水、Milli-Q 水 (Millipore) を適宜使用し、必要に応じて 121°C、20 分間でオートクレーブ滅菌処理を行なった。

RNA 関連実験において使用する水は、Milli-Q 水に 1% (w/v) diethyl pyrocarbonate (DEPC) を加え、37°Cで一晩振とう後に 121°C、120 分間オートクレーブ処理を行うことで RNase を完全に除去したものを用いた。

各種制限酵素及び修飾酵素類は、TaKaRa、Roche 及び New England Biolabs の製品を添付されたプロトコルに従って使用した。

### 0-2-2) 培地

本博士論文では以下の培地を使用した。寒天培地を作製する場合は、培地に 1.5% agar を加えた。

(1) Czapek-Dox 培地 ; 1% glucose, 7 mM KCl, 11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 70 mM NaNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1×Trace elements\*

\*1000×Trace elements; 3.6 mM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 31 mM ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.6 mM CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.7 mM MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.3 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 0.04 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O

(*niaD*株は 70 mM NaNO<sub>3</sub> の代わりに 70 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いた。*sC*株は 33 mM L-methionine、*pyrG*株は 20 mM uracil 及び 20 mM uridine をそれぞれ添加した。実験条件に応じて炭素源を適宜変更した。)

(2) YPD 培地 ; 0.5% Bacto yeast extract, 1% Bacto peptone, 1% glucose

(実験条件によって適宜炭素源を変更した。)

(3) LB+Amp 培地 ; 1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, 50 µg/ml Ampicillin

(4) SOB 培地 ; 2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1×無機塩類\*

\*無機塩類 ; 1.0 M NaCl, 0.25 M KCl, 1.0 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O

### 0-2-3) 分生子懸濁液の調製

分生子形成培地として Czapek-Dox 寒天培地を用い、植菌後は十分量の分生子が形成するまで 30℃で 7 日間程度静置培養した。滅菌済みの Tween 溶液 [0.8% NaCl, 0.025% (v/v) Tween20] 5 ml を分生子が形成した寒天培地上にまき、白金耳で分生子をかき取り懸濁した。滅菌済みミラクロス (Calbiochem) にて懸濁液をろ過し、懸濁液を滅菌済みチューブに集めた。3,500 rpm で 5 分間遠心した後上清を捨て、滅菌水 5.0 ml に分生子を懸濁した。これを分生子懸濁液とし、分生子数は血球計算版 (Thoma) にて計測した。

#### 0-2-4) 大腸菌コンピテントセルの調製 (Hanahan. 1983)

塩化カルシウム法によって *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 株のコンピテントセルを調製した。  
-80℃に保存してある *E. coli* DH5 $\alpha$ 株のグリセロールストックを LB 寒天培地に植菌し、37℃で 10 時間程度培養した。単一コロニーを LB 液体培地に植菌して 37℃で 8 時間程度振とう培養し、培養液 20  $\mu$ l を 500 ml 羽根つき三角フラスコに作製した 20 ml SOB 培地に加えた後、O.D.600 が 0.4~0.6 に達するまで 18℃、180 rpm で振とう培養した。培養液を 10 分間氷上で静置後、50 ml 遠心チューブに培養液を移し入れ、4℃、3,000 $\times$ g で 15 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿として得られた菌体を氷冷 TB\* 15 ml に懸濁し、再び 10 分間氷上に静置した。4℃、3,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を取り除いたところに氷冷 TB 4 ml を加えて菌体を懸濁し、そこに Dimethyl sulfoxide (DMSO) 280  $\mu$ l を添加して氷上で 10 分間静置した。1.5 ml 遠心チューブに 50  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素で急冷した後、-80℃で凍結保存した。

\*TB: PIPES 0.6 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.44 g, KCl 3.72 g を約 180 ml の MilliQ 水に溶解させ、5 N KOH により pH 6.7~6.8 に調整した。MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.18 g を加え、MilliQ 水で全容 200 ml になるように調整し、0.22  $\mu$ m フィルターを用いて濾過滅菌し、4℃で保存した。

#### 0-2-5) 大腸菌の形質転換

-80℃で保管してある *E. coli* DH5 $\alpha$ のコピテントセル 50  $\mu$ l を氷上で解凍し、目的のプラスミド溶液を加えた。氷中で 30 分間静置し、42℃で 30 秒間熱処理を行った後急冷した。LB + amp 寒天培地に接種し、37℃で 8~12 時間培養した。

#### 0-2-6) アルカリ SDS 法を用いた大腸菌からのプラスミド DNA の回収

LB + amp 寒天培地で培養して得られた大腸菌のコロニーをかき取り、LB + amp 液体培地 4 ml に植菌し、37℃、120 rpm で 12~16 時間振とう培養した。培養液を 1.5 ml チューブに移し、15,000 rpm で 30 秒間遠心した後上清を取り除いた。そこに再び培養液を加えて同様に遠心し、上清を取り除いたところに GTE 溶液 [50 mM glucose、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)] 100  $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサーを用いて沈殿を懸濁させた。ここに NaOH-SDS 溶液 (0.2 M NaOH、1% SDS) 200  $\mu$ l を加えて穏やかに混合し、氷中で 3~5 分間静置した後に酢酸カリウム溶液 [3 M 酢酸カリウム、2.3% (v/v) 氷酢酸] 150  $\mu$ l を加えて混合した後、氷中で 5 分間以上静置した。4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、そこに等量のイソプロパノールを加え混合後、4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を取り除き沈殿を乾燥させた後、TER 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 10  $\mu$ g/ml RNase A] 200  $\mu$ l に懸濁し、37℃で 30 分以上静置することで RNA を除去した。その後、フェノール・クロロホルム抽出処理を行い、エタノール沈殿により得られた沈殿を TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 40  $\mu$ l に溶解させた。得られたプラスミド DNA をアガロースゲル電気泳動に供することで、取得できたことを確認した。

#### 0-2-7) Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応

PCR 反応には、TaKaRa TP240、TaKaRa TP600 及び BIO RAD T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler を用いた。DNA polymerase には、Ex-Taq (TaKaRa)、Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) 及び KOD FX Neo (TOYOBO) を適宜使用し、各 DNA Polymerase に添付されたプロトコルに従って反応を行なった。PCR プライマーの合成はユーロフインジェノミクス社に依頼した。

#### 0-2-8) 制限酵素による DNA の切断

DNA の制限酵素処理を行う際は、各制限酵素に添付されていた推奨緩衝液中で反応させた。制限酵素量は反応系の 1/10 量以上にならないように設定した。

#### 0-2-9) アガロースゲル電気泳動による DNA

TAE 緩衝液 [40 mM Tris, 20 mM acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)] を用いて 0.8% アガロ

ースゲルを作製し、TAE 緩衝液中で泳動を行なった。泳動後のアガロースゲルを 0.5 µg/ml エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV-トランスイルミネーター (Ultra-violet Products) を用いて UV を照射することで、DNA を蛍光として検出した。分子量マーカーには、1 kb DNA ladder (New England Biolabs) を用いた。

#### 0-2-10) ガラスビーズによる DNA 断片の回収

アガロースゲルからの DNA 抽出には、MP-Biomedicals の GENE CLEAN Kit を用いた。制限処理後の DNA をアガロースゲル電気泳動により分離し、UV 照射下で目的の DNA 断片のアガロースゲルを切り出した。1.5 ml 遠心チューブに切り出した断片を入れ、そこに NaI solution 500 µl を加えて 55°C で約 10 分間インキュベートすることでアガロースゲルを完全に溶解させた。そこに、EZ-GLASSMILK 2 µl を加えて穏やかに混合し、氷上に 5 分間静置した。13,200 rpm で 5 秒間遠心し、上清を取り除いた所に New Wash 500 µl 加えて沈殿を懸濁させ、13,200 rpm で 5 秒間遠心した。上清を除いた所に再び New wash buffer 500 µl 加えて沈殿を懸濁し、13,200 rpm、5 秒間遠心した。上清を完全に取り除き、そこに TE 緩衝液 5 µl を加えて沈殿を懸濁させ、55°C に 3 分間静置することでガラスビーズに吸着した DNA 断片を溶出させた。13,200 rpm で 30 秒間遠心し、得られた上清を新しい 1.5 ml 遠心チューブに回収した。再度 TE 緩衝液 5 µl を加えて DNA 断片の溶出操作を行い、先に取得していた溶液と合わせて DNA 断片溶液を取得し、アガロース電気泳動により目的の DNA 断片を取得できたことを確認した。

#### 0-2-11) ライゲーション反応

調製したベクター DNA とインサート DNA の量比が 1 : 3 になるように混合し、DNA 溶液と等量の DNA ligation kit (Mighty Mix) (TaKaRa) を加え、16°C で 30 分間反応させた。ライゲーション反応後の DNA 溶液は実験 (0-2-5) に大腸菌への形質転換に用いた。得られたライゲーション候補株は、実験 (0-2-6) に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素処理により目的のプラスミドが得られたことを確認した。

#### 0-2-12) 麹菌の遺伝子破壊株の作製

目的の遺伝子上流及び下流約 1 kb をそれぞれ増幅できるプライマーを設計し、上

増幅用のリバースプライマー及び下流増幅用のフォワードプライマーの 5'末端には選択マーカー遺伝子との相同配列を付加させた。さらに、用いる選択マーカー遺伝子を増幅させるためのプライマーを設計し、PCR により目的の DNA 断片をそれぞれ増幅させた。得られた 3 つの DNA 断片をテンプレートとして、目的の遺伝子の上流増幅用のフォワードプライマー及び下流増幅用のリバースプライマーを用いて fusion PCR を行い、得られた DNA 断片を形質転換に用いた。

#### 0-2-13) 麴菌の形質転換

##### (1) 形質転換用麴菌プロトプラストの調製

麴菌の形質転換には、プロトプラスト-PEG 法を用いた (Gomi *et al.*, 1987)。200 ml 三角フラスコに作製した YPD 液体培地 50 ml に宿主株の分生子を適量植菌し、30℃、120 rpm で 24 時間振とう培養して得られた菌体をガラスフィルター (3G1) でろ過し、滅菌水で洗浄した。火炎滅菌した葉さじを用いて菌体の水分を除いた後、0.22 µm フィルターでろ過滅菌したプロトプラスト化溶液 [2.5 mg/ml Yatalase、0.8 M NaCl、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)] 10 ml に菌体を加えた。30℃で 2 時間インキュベートし、麴菌の細胞壁を消化した。プロトプラスト化処理を行なった菌体を滅菌済みのミラクロスで 50 ml 遠心チューブにろ過し、2,000 rpm で 5 分間遠心した。0.8 M NaCl 20 ml で沈殿を懸濁し、2,000 rpm で 5 分間遠心した後、上清を除いたところに再び 0.8 M NaCl 20 ml を加えて沈殿を懸濁し、2,000 rpm で 5 分間遠心することでプロトプラストを洗浄した。上清を除いたところに必要量の SolI [6M KCl、10 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加えてプロトプラストを懸濁し、さらに加えた SolI の 0.2 倍量の SolII [40% PEG4000、10 mM CaCl<sub>2</sub>、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加え、よく混和した。

##### (2) 麴菌宿主株への遺伝子導入

プラスミド DNA は麴菌ゲノム上に相同組換えによって組み込むために、適切な制限酵素を用いて線状化した。遺伝子破壊株を作製する際は、実験 (0-2-12) に従って取得した DNA 断片を用いた。50 ml 遠心チューブに (1) で調製した 0.2 ml プロトプラスト溶液をとり、そこに制限酵素処理済みプラスミド DNA または PCR 断片を加えて混合し、氷中で 30 分以上静置した。ここに SolII 1 ml を加えてよく混合し、室温で 15 分間静置した。その後、SolI 10 ml を加えてよく混合し、2,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を

除いたところに SolI 0.2 ml を加えてプロトプラストを懸濁した。この懸濁液を形質転換用培地\*の上に播き、その上から形質転換用軟寒天培地\*\*を重層した。プロトプラストが培地中に均一になるようよく混合し、30℃で5日間程度培養した。生えてきた形質転換候補株の分生子をかき取り、新しい寒天培地に植菌した。

\*形質転換用培地; Czapek-Dox 培地に 0.8 M NaCl 及び 1.5% agar を加えたものを用いた。

\*\*形質転換用軟寒天培地; Czapek-Dox 培地に 0.8 M NaCl 及び 0.6% agar を加えたものを用いた。

### (3) PCR による形質転換候補株の選抜

滅菌済みの爪楊枝を用いて形質転換候補株の分生子をかき取り、400 µl YPD 培地の入った 1.5 ml 遠心チューブに植菌し、30℃で2~3日間静置培養した。15,000 rpm で5分間遠心し、培養上清を取り除いたところに菌体と等量のガラスビーズを加え、-80℃で3時間以上静置して菌体を凍結させた。凍結した菌体が入ったチューブをボルテックスミキサーに5分間かけ、その後-80℃に5分間静置した。再び5分間ボルテックスミキサーにかけることで菌体を破碎した。ここに溶菌溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、0.1 M NaCl、2% SDS] 200 µl 及び TE 緩衝液 200 µl を加え、穏やかに攪拌した後室温で15分間放置した。その後、フェノール・クロロホルム (1 : 1) 400 µl を加えて穏やかに攪拌し、15,000 rpm、10分間室温で遠心した。上層を新しい 1.5 ml 遠心チューブに移し、そこにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 400 µl を加え、穏やかに攪拌後 15,000 rpm、5分間室温で遠心した。上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、エタノール沈殿処理を行ない、乾燥させた沈殿を TER 緩衝液 50 µl に溶解した。得られた DNA 溶液をテンプレートとして、適当なプライマーを用いて PCR 反応を行い、目的の長さの DNA 断片が増幅された株を形質転換株として選抜した。得られた形質転換株は Czapek-Dox 培地に2~3回植え継ぐことで純化し、実験に用いることとした。

### 0-2-14) 麹菌からの Total RNA の抽出

液体培養して得られた菌体を液体窒素で凍結破碎し、予め 1.5 ml 遠心チューブに分注しておいた ISOGEN (Nippon Gene) 1 ml に破碎した菌体を加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した。室温で5分間静置した後、クロロホルム 0.2 ml を加えてボ



ルテックスミキサーで 15 秒以上攪拌し、室温で 3 分間静置した。4℃、12,500 rpm で 15 分間遠心し、上層を新しい 1.5 ml 遠心チューブに回収した。ここに回収した上層と等量の 2-propanol を加え、よく混合した後に室温で 10 分間静置した。4℃、12,500 rpm で 10 分間遠心し、上清を除いたところに 70% エタノール 1 ml を加え、4℃、12,500 rpm で 5 分間遠心することで沈殿を洗浄した。沈殿を乾燥させた後、DEPC 水 30  $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌して沈殿を溶解させた。得られた RNA の濃度を NanoDrop を用いて測定した。

#### 0-2-15) complementary DNA (cDNA) の合成

##### (1) DNase 処理

抽出した Total RNA 溶液中に混入している染色体 DNA を除去するために、Recombinant DNase I (RNAase-free) (TaKaRa) を用いて以下の反応系を調製し、37℃で 30 分間反応させることで DNase 処理を行なった。

Total RNA	X $\mu$ l (20-50 $\mu$ g)
10 $\times$ DNase I buffer	5 $\mu$ l
Recombinant DNase I (RNase-free)	2 $\mu$ l (10 U)
DEPC water	(43-X) $\mu$ l
<hr/>	
Total	50 $\mu$ l

反応終了後、0.5 M EDTA 2.5  $\mu$ l を加えて 80℃で 2 分間インキュベートし、DEPC 水 47.5  $\mu$ l を加えた。ここにエタノール沈殿処理を行うために、100% エタノール 250  $\mu$ l と 3 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) 10  $\mu$ l を加え、-20℃で 20 分間静置した。4℃、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を取り除いたところに 70% エタノール 200  $\mu$ l を加えて 4℃、15,000 rpm で 1 分間遠心した。乾燥させた沈殿を DEPC 水 20  $\mu$ l に溶解させた。

##### (2) cDNA の合成

cDNA 合成には、PrimeScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いて以下の反応系を調製した。

DNase 処理済み RNA	X $\mu$ l (1-5 $\mu$ g)
oligo dT18 primer	1 $\mu$ l

2.5 mM dNTP mix 4  $\mu$ l

DEPC water (10-X)  $\mu$ l

---

Total 15  $\mu$ l

調製した反応液を 65°C で 5 分間反応させた後氷上で急冷させ、そのまま氷上で 10 分間静置した。ここに以下の反応溶液を加え、42°C で 60 分間反応させた。

5×PrimeScript II Buffer 4  $\mu$ l

PrimeScriptII RTase 1  $\mu$ l

---

Total 5  $\mu$ l

反応終了後に 70°C に 15 分間静置し、氷上で静置した。

#### 0-2-16) 定量 RT-PCR

PCR 反応には Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を使用した。cDNA (<10 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、Fast SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ l、0.3 mM primer を混合し、全容 20  $\mu$ l になるように滅菌水を用いて調整した。1 サンプル当たり 3 連で調整して測定した。測定には Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR System を使用し、解析には StepOne™ Software Version 2.3 を用いた。操作は操作マニュアルに従って行い、予めプライマーごとの  $T_m$  値の前後で段階的に温度を変化させて PCR 反応を行い、アニーリング温度及び伸長時間を決定した。PCR 反応の際には、最後に Melting curve の測定の設定を行い、プライマー特異的に伸長反応が行われていることを確認した。PCR 反応終了後は、ベースライン補正後の Threshold にて C(t)ライン (Threshold cycle) を設定し、同条件において測定した内部標準遺伝子の発現量を用いて標準化し、内部標準遺伝子の発現量に対する発現比を  $\Delta\Delta C(t)$ 法により求めた。

#### 0-2-17) 菌体の凍結乾燥

培養して得られた菌体を -80°C 保存または液体窒素を用いて凍結させ、凍結乾燥機 (TAITEC, VD-550R) を用いて凍結乾燥させた。

#### 0-2-18) サザンブロット解析

##### (1) ゲノム DNA の抽出

YPD 液体培地 10 ml に適量の分生子を植菌し、30℃、120 rpm で 24~48 時間振とう培養した。得られた菌体を -80℃ に 3 時間以上放置することで凍結させ、液体窒素を用いて凍結破砕した。破砕した菌体を 1.5 ml 遠心チューブに入れた TE 緩衝液 400  $\mu$ l に懸濁し、そこに溶菌溶液 400  $\mu$ l を加えて穏やかに攪拌した後、室温に 15 分間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しい 2.0 ml 遠心チューブに回収し、そこにフェノール・クロロホルム (1:1) 0.8 ml を加えて穏やかに攪拌した。室温で 15,000 rpm、10 分間遠心して上層を新しい 2.0 ml 遠心チューブに回収する操作を 3 回繰り返した。得られた上層にフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 0.8 ml を加えて穏やかに攪拌後、室温で 15,000 rpm、5 分間遠心し、得られた上層をエタノール沈殿処理することでゲノム DNA を沈殿として回収した。乾燥させたゲノム DNA を TER 緩衝液に溶解させ、37℃ に 30 分間以上静置することで RNase 処理を行なった。

## (2) プローブ液の作製

PCR により目的の DNA 断片を増幅してアガロースゲル電気泳動に供した後、ガラスビーズを用いて DNA 断片を回収した。100 ng 相当の DNA 溶液を滅菌水で 20  $\mu$ l にフィアルアップし、これを 10 分間煮沸した後氷上で急冷した。氷上に 10 分間静置した後、labelling reagent 20  $\mu$ l を加えて混合し、さらに glutaraldehyde solution 20  $\mu$ l を加えて混合し、37℃ に 10 分間静置したものをプローブ液として用いた。

プローブ液の作製には、GE Healthcare Amersham™ ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling System を用いた。

## (3) サザンブロット

得られたゲノム DNA 溶液を 200  $\mu$ l の反応系で目的の制限酵素を用いて一晩制限酵素処理を行なった。エタノール沈殿によりゲノム DNA を沈殿として取得して乾燥させた後、TE 緩衝液 15  $\mu$ l に溶解させた。得られたゲノム DNA 溶液を 50 V にてアガロースゲル電気泳動に供し、泳動ラインが完全に流れきるまで泳動した。エチジウムブロマイドで染色後、変性溶液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) に浸して 30 分間穏やかに振とうさせた。キャピラリーブロット法にてゲノム DNA を膜 (Biodyne® B Nylon Membrane 0.45  $\mu$ m/PALL Corporation) に転写させるために、転写溶液に 0.4 M NaOH 溶液を用いてアルカリトランスファーを 3 時間以上行った。転写後の膜を 20×SSC [3 M NaCl, 0.3 M Trisodium Citrate Dihydrate, pH 7.0] を希釈して調整した 5×SSC 25 ml に浸し、5 分間振

とうさせる操作を2回行い、キムタオルにて膜の水分を十分に除いた。ハイブリバッグに膜と ECL [Gold hybridization buffer (GE Healthcare), 5%(w/v) Blocking agent (GE Healthcare), 0.5 M NaCl] 10 ml を入れ、42℃で1時間振とうさせることでプレハイブリダイゼーションを行った後、プローブ液を加えて42℃で16~20時間振とうさせることでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、予め42℃に温めておいた ECL wash buffer [6 M Urea, 0.4%(w/v) SDS, 0.5×SSC] 25 ml に膜を浸し、42℃で20分間振とうさせる操作を2回行った後、室温で2×SSC 25 ml 中で5分間振とうさせる操作を2回行った。キムタオルを用いて膜の水分を十分に除き、検出試薬 (ECL Detection reagent 1,2) に膜を浸した後、ImageQuant LAS4000 (GE ヘルスケ・ジャパン) を用いてバンドの検出を行った。

ECL 及び検出試薬には、GE Healthcare Amersham™ ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling System を用いた。

## 第1章

# カーボンカタボライト抑制関連因子 CreA 及び CreB の制御による有用物質高生産

### 1-1) 緒言

麹菌は多様な多糖類分解酵素遺伝子を有しており、特にデンプン分解酵素の $\alpha$ -アミラーゼを分泌生産する能力が非常に高い特長を有している。そのため、麹菌は古来より清酒醸造などの食品産業に加えて、その安全性の高さから医薬品の製造などにも用いられてきた。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼを含む多くの多糖類分解酵素遺伝子は CCR を受けることが知られており、CCR によりこれらの遺伝子の発現が抑制されることで酵素生産性が低下することが長年問題視されてきた。

糸状菌の CCR 制御には、広域制御型転写因子 CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB が関与しており、これまでに麹菌の *creA* と *creB* 単独及び二重破壊株では CCR が解除され、1%デンプンを含む YP 培地では $\alpha$ -アミラーゼ生産性が野生株よりも増加することが観察され、特に *creA* 及び *creB* 二重破壊株は単独破壊株よりも高い $\alpha$ -アミラーゼ活性を示すことを明らかにした (Ichinose *et al.*, 2014)。しかし、酵素の生産性は培養条件によって大きく変化することから、炭素源の種類や濃度、さらには液体培養及び固体培養の違いが、これらの破壊株の酵素生産性に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで本章では、炭素源の種類や濃度、培養時間及び培養方法を変化させた多様な培養条件において、*creA* 及び *creB* の単独及び二重破壊株は CCR が解除され、 $\alpha$ -アミラーゼを高生産できるか解析した。

さらに、*creA* 及び *creB* 遺伝子の破壊は、 $\alpha$ -アミラーゼの高生産化には効果があるものの、他の多糖類分解酵素の生産性にどのような影響を及ぼすかは明らかになっていない。そこで、麹菌が有するセルロース系バイオマス分解酵素に着目した。麹菌はキシナーゼやセルラーゼなどのバイオマス分解酵素遺伝子を多数有しているものの、これらの酵素生産量は $\alpha$ -アミラーゼと比較して極めて少ない。バイオマス分解酵素は $\alpha$ -アミラーゼと同様に産業用酵素として利用され、特に近年では石油代替エネルギーとして注目されているバイオエタノール生産にも利用されていることから、バイオマス分解酵素の高生産化は産業上重要な課題である。

バイオマス分解酵素を生産する能力が高い糸状菌として *Trichoderma reesei* が知られている。これまでに *T. reesei* において、CreA のオーソログである Cre 1 及び CreB オーソログの Cre2 の変異株は CCR が解除され、バイオマス分解酵素の生産性が向上することが報告されている (Nakari-Setälä *et al.*, 2009; Denton and Kelly, 2011)。このことから、麴菌においても *creA* 及び *creB* を破壊することで同様にバイオマス分解酵素の生産性が向上する可能性が考えられた。そこで、麴菌において *creA* 及び *creB* の単独及び二重破壊株は $\alpha$ -アミラーゼ以外にもバイオマス分解酵素の高生産も可能か検証することにした。

## 1-2) 実験方法

### 1-2-1) 菌株

本章で使用した菌株を以下に記した。 $\Delta ligD::loxP$  *pyrG::niaD* 株を野生株として使用した。

Table 1-1 Strain

strain	Genotype	Reference
$\Delta ligD::loxP$ <i>pyrG::niaD</i>	$\Delta ligD::loxP$ ; <i>pyrG</i> <sup>+</sup> ; <i>niaD</i> <sup>+</sup> ; <i>sC</i> <sup>-</sup>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
$\Delta creA$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta creA::sC$ ; <i>pyrG</i> <sup>+</sup> ; <i>niaD</i> <sup>+</sup>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
$\Delta creB$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta creB::pyrG$ ; <i>sC</i> <sup>-</sup> ; <i>niaD</i> <sup>-</sup>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
$\Delta creA\Delta creB$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta creA::sC$ ; $\Delta creB::pyrG$ ; <i>niaD</i> <sup>-</sup>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)

### 1-2-2) PCR プライマー

本章で使用した PCR プライマーを以下に記した。

Table 1-2 Nucleotide sequences of primers

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
amyB qRT-PCR sen	TACTATCCACTCCTCAACGC
amyB qRT-PCR anti	TGAATGCTGCGACGTTCTTG
xlnR qRT-PCR sen	TGCAGCGGACATATTAGAG
xlnR qRT-PCR anti	ACGACACTGGGACTGACATC
xynG2 qRT-PCR sen	ACGGCTACCTAGCTGTGTAC
xynG2 qRT-PCR anti	AGGTAACCTGGCCCTTGTAG

Table 1-2 Nucleotide sequences of primers

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
RT_F_bglC	CCCCGGTCTGTACGAGGATC
RT_R_bglC	CGGTCCAGTCCTGAGCCGAA
histoneH4 qRT-PCR sen	CAAGCGTATCTCTGCCATGA
histoneH4 qRT-PCR anti	CACCGAAACCGTAGAGGGTA

### 1-2-3) 培地

- YP 培地

0.5% Bacto™ yeast extract, 1% Bacto™ peptone

ここに目的に応じて 1%または 5%の炭素源（マルトース、グルコース、デンプンまたはキシロース）を添加した。

- 小麦フスマ培地

5g 小麦フスマ

（小麦フスマはメッシュ径 1.7 mm の標準フルイを用いて、小麦フスマに付着していた微粒子を除いたものを使用した。）

### 1-2-4) 培養方法

(1) YP 培地を用いた液体培養

200 ml 三角フラスコに 50 ml の各種炭素源を含む YP 液体培地を作製し、ここに各菌株の分生子を  $2 \times 10^6$  個植菌し、30℃、120 rpm で振とう培養した。

(2) 小麦ふすまを用いた固体培養

200 ml 三角フラスコに 5 g の小麦フスマを準備し、そこに  $1 \times 10^6$  個の分生子を含む 2 ml 滅菌水を加えてよく混合し、30℃で 48 時間静置培養した。24 時間の時点で一度小麦フスマ全体が混ざるようによく混合した。

### 1-2-5) 粗酵素液の調製

YP 液体培地で振とう培養し、ミラクロスでろ過することで培養上清と菌体を取得した。菌体は脱塩水で洗浄した後、キムタオルで水分を取り除き、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）50 ml に入れて 30℃、120 rpm で 1 時間振とうすることで、細胞

壁に吸着した $\alpha$ -アミラーゼなどの酵素を緩衝液中に遊離させた (Sato *et al.*, 2011)。その後、ミラクロスでろ過することで細胞壁吸着画分と菌体を分別し、菌体は凍結乾燥させることで乾燥菌体重量を測定した。酵素活性測定には、培養上清及び細胞壁吸着画分をそれぞれ用いた。

小麦フスマ培地で培養した後、10 mM 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 50 ml を加えて穏やかに攪拌し、室温で 30 分間静置した。ミラクロスでろ過し、得られた抽出液を活性測定に使用した。活性測定に使用する前に 15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心することで、抽出液中の培地の残渣を取り除いた。

#### 1-2-6) 粗酵素液の透析

粗酵素液 5 ml を透析チューブ (セルロースチューブ 20/32、エーディア株式会社) に入れ、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) 500 ml に浸し、4°C で 4 時間スターラーを用いて攪拌した。新しい緩衝液に交換して同様に 4 時間攪拌し、再び緩衝液を交換した後、4°C で一晩攪拌して得られた粗酵素液をキシラナーゼ、セルラーゼ及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性測定に用いた。

#### 1-2-7) $\alpha$ -アミラーゼ活性測定

##### (1) 基質溶液の調製

可溶性デンプン 0.5 g を約 30 ml の脱塩水に加え、ホットスターラーを用いて完全に溶解させた。その後、溶液の温度が室温程度になるまで放置し、0.2 M 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 10 ml を加え、脱塩水で 50 ml になるように調整した。

##### (2) 10×ヨウ素溶液の調製

脱塩水にヨウ素 0.159 g、ヨウ化カリウム 0.50 g、35% 塩酸 71 ml を加え、ヨウ素が完全に溶けるまでよく混合した。脱塩水で 500 ml になるように調整し、遮光した状態で保存した。使用する際は、1×ヨウ素溶液になるように脱塩水を用いて希釈した。

##### (3) 活性測定方法

第4回改正国税庁所定分析法に従い、活性測定を行った。1% 可溶性デンプン溶液 1 ml を試験管にとり、40°C に 5 分間静置することで予熱処理を行った。そこに粗酵素液 50  $\mu$ l を加え、経時的 (0, 5, 10, 15 分) に反応液を 10  $\mu$ l とり、予め試験管に入れておいた 1 ×



ヨウ素溶液 1 ml に加えてよく混合した。10 mm セルを用いて 670 nm で比色し、透過率 T% を測定した。測定した T% から最小二乗法により近似曲線を計算し、T% が 66.0 となる時の時間 t を求め、以下の計算式に代入して得られた値を活性値とした。対照として、滅菌水 1 ml に粗酵素液 50  $\mu$ l を加えてよく混合した後に 10  $\mu$ l とり、1  $\times$  ヨウ素溶液 1 ml へ加えたものを用いた。

$\alpha$ -アミラーゼ活性 (U/ml) は、

$\alpha$ -アミラーゼ活性 (U/ml) = デンプン溶液量(ml) $\times$ [1 / 酵素液量(ml)] $\times$ [30 / 反応時間 t (min)]

の計算式を用いて求めることができることから、本実験では以下の計算式を用いて  $\alpha$ -アミラーゼ活性を算出した。

$\alpha$ -アミラーゼ活性 (U/g dry mycelia weight) = {培養上清画分 [1 $\times$ (1/0.05) $\times$ (30/t)] + 細胞壁吸着画分 [1 $\times$ (1/0.05) $\times$ (30/t)]} / 乾燥菌体重量 (g)

※小麦ふすま培地を用いた場合

$\alpha$ -アミラーゼ活性 (U/g wheat bran) = 1 $\times$ (1/0.05) $\times$ (30/t) $\times$ 抽出率(100/10)

#### 1-2-8) キシラナーゼ及びセルラーゼ活性測定

##### (1) 基質溶液の調製

1 % キシラン (Xylan, From Beechwood, >90% xylose residues、SIGMA) または 1% CMC (Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt) を 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に溶解させた。1% CMC はホットスターラーを用いて完全に溶解させた。

##### (2) 活性測定方法

酵素反応で生じた還元糖を DNS 法により定量することで活性を測定した。1.5 ml 遠心チューブに基質溶液 100  $\mu$ l をとり、50 $^{\circ}$ C で 5 分間予熱処理を行った。ここに透析済みの粗酵素液 150  $\mu$ l を加え、50 $^{\circ}$ C で反応させた。反応時間は、キシラナーゼ活性測定では 10 分間、セルラーゼ活性測定では 20 分間とした。DNS 試薬 [0.5% (w/v) 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)、1.6% NaOH、30% (w/v) 酒石酸カリウムナトリウム 4 水和物] 400  $\mu$ l を加えて反応を停止させた後、5 分間煮沸することで発色させた。氷上で冷却後に 540 nm における吸光度を測定した。対照には、DNS 試薬を加える直前に基質溶液に粗酵素液を添加し、同様に煮沸及び氷上での冷却処理を行ったものを用いた。検

量線の作成には、キシロース又はグルコース溶液を用いた。1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  のキシロース又はグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 U として活性値 (U/ml) を求め、得られた活性値を乾燥菌体重量で割ることで菌体量当たりの活性 (U/g dry mycelia weight) を算出した。小麦ふすま培地を用いた場合は、 $[(\text{U/ml}) \times 10 (\text{抽出率})]$  を活性 (U/g wheat bran) とした。

#### 1-2-9) $\beta$ -グルコシダーゼ活性測定

##### (1) 基質溶液の調製

1 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside を含む 20 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を基質溶液として用いた。

##### (2) 活性測定方法

基質溶液 400  $\mu\text{l}$  を試験管にとり、50°C で 5 分間予熱処理を行った。そこに透析済みの粗酵素液 10  $\mu\text{l}$  を加え、50°C で 20 分間反応させた。1 M 炭酸ナトリウム溶液 800  $\mu\text{l}$  を加えることで反応を停止させると同時に、酵素反応により遊離した *p*-nitrophenol を発色させ、400 nm における吸光度を測定した。対照には、1 M 炭酸ナトリウム溶液を加える直前に基質溶液に粗酵素液を加えたものを用いた。検量線の作成には、*p*-nitrophenol 溶液を用いた。1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の *p*-nitrophenol を遊離させる酵素量を 1 U として活性値 (U/ml) を求め、得られた活性値を乾燥菌体重量で割ることで菌体量当たりの活性 (U/g dry mycelia weight) を算出した。小麦ふすま培地を用いた場合は、 $[(\text{U/ml}) \times 10 (\text{抽出率})]$  を活性 (U/g wheat bran) とした。

#### 1-2-10) Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

##### (1) サンプルの調整

タンパク質溶液に 100% trichloroacetic acid (TCA) を終濃度 10% となるように加え、氷上で 15 分間静置した。4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、タンパク質を沈殿させた。上清を除いた所に 80%(v/v) acetone 500  $\mu\text{l}$  を加え、4°C、15,000 rpm、5 分間遠心する操作を計 2 回行なった。沈殿を乾燥させた後、1×SDS-Sample Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10%(v/v) glycerol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue, 5%(v/v) 2-mercaptoethanol] 25  $\mu\text{l}$  を加え、ボルテックスミキサーにより沈殿を完全に溶解させた。3 分間煮沸することで SDS

化させ、SDS-PAGE に用いた。

## (2) SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) に従って行なった。10% アクリルアミド分離ゲル及び 5% アクリルアミド濃縮ゲルを 1 枚あたり以下の組成で作製した。

### 10% アクリルアミド分離ゲル

30%(w/v) acrylamide gel stock solution\* 1.34 ml

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 1 ml

10%(w/v) SDS 40 µl

10%(w/v) Ammonium Peroxodisulfate (APS) 40 µl

tetramethylethylenediamine (TEMED) 2 µl、

Milli-Q 水 1.58 ml

---

Total 4.0 ml

### 5% アクリルアミド濃縮ゲル

30%(w/v) acrylamide gel stock solution\* 250 µl

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 375 µl

10%(w/v) SDS 15 µl

10%(w/v) APS 20 µl

tetramethylethylenediamine (TEMED) 1.5 µl、

Milli-Q 水 840 µl

---

Total 1.5 ml

\*30%(w/v) acrylamide gel stock solution; 30%(w/v) acrylamide, 0.96%(w/v)

N,N'-methylenebisacrylamide

SDS-PAGE 泳動緩衝液 [25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%(w/v) SDS] を用いて、ゲル 1 枚あたり 20 mA で泳動を行なった。分子量マーカーには、Precision Plus Protein™ Unstained Standards (BIO-RAD) を用いた。

## (3) CBB 染色

泳動後のゲルを CBB 染色液 [50%(v/v) methanol, 10%(v/v) acetic acid, 2.5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue (CBB)] で 1 時間程度穏やかに振とうすることでゲルを染色した。

その後、染色済みのゲルを脱色液 [25%(v/v) methanol, 7%(v/v)acetic acid] 中で振とうすることで脱色した。

### 1-3) 実験結果

#### 1-3-1) 高濃度マルトース条件下における $\alpha$ -アミラーゼ生産性

麹菌において *creA* 及び *creB* を破壊すると CCR が解除され、1%デンプンを炭素源とした YP 液体培地において  $\Delta creA$ 、 $\Delta creB$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  は野生株よりも高い $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示すことをこれまでに明らかにした。そこで、炭素源濃度及び培養時間を変化させても同様に CCR が解除され、 $\alpha$ -アミラーゼを高生産するか解析した。

$\alpha$ -アミラーゼ生産の誘導基質であるマルトースを炭素源とし、5%マルトースを含む YP 液体培地において 48 時間培養し、得られた培養上清及び細胞壁吸着画分を 1:1 で混合したサンプルを SDS-PAGE 解析に用いた。その結果、野生株と比較して全ての破壊株で 50 kDa 付近に $\alpha$ -アミラーゼのバンドが濃く観察された (Fig. 1-1 A)。

次に、1%マルトース又は 5%マルトース培地で 48 時間培養した条件における $\alpha$ -アミラーゼ生産性を解析した結果、野生株では 5%マルトース培地における $\alpha$ -アミラーゼ活性が 1%マルトース培地の半分以下まで減少した (Fig. 1-1 B)。一方、 $\Delta creA$ 、 $\Delta creB$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  は炭素源濃度による $\alpha$ -アミラーゼ活性の変化はなく、野生株よりも高い活性を示し、特に  $\Delta creA\Delta creB$  は顕著に高い $\alpha$ -アミラーゼ活性を示した。

さらに、5%マルトース培地で 48 時間又は 72 時間培養した条件における $\alpha$ -アミラーゼ生産性を解析した。その結果、48 時間と比較して 72 時間培養では $\alpha$ -アミラーゼ活性が全ての株で減少したものの、培養時間に依らず野生株よりも高い $\alpha$ -アミラーゼ活性を示した (Fig. 1-1 C)。そこで、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* の発現量を定量 PCR により解析した結果、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では野生株よりも *amyB* の発現量が顕著に増加しており、48 時間と 72 時間で *amyB* の発現量に差は認められなかった (Fig. 1-1 D)。一方、 $\Delta creB$  は野生株と比較して発現量は増加するものの、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  よりも低い値を示し、72 時間の時点での *amyB* の発現量は野生株と同様に 48 時間の時点よりも低下した。

#### 1-3-2) 高濃度グルコース及びデンプン培地における $\alpha$ -アミラーゼ生産性

実験 1-3-1) の結果から、5%マルトースを炭素源とした YP 液体培地において、 $\Delta creA$ 、 $\Delta creB$  及び  $\Delta creA \Delta creB$  は野生株よりも高い $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示すことが明らかになった。そこで、マルトース以外の炭素源においても同様に $\alpha$ -アミラーゼを高生産できるか解析した。まず、炭素源として 5%グルコースを含む YP 液体培地において $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した結果、野生株及び $\Delta creB$  ではほとんど活性が検出できないのに対し、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA \Delta creB$  では高い活性を示した (Fig. 1-2 A)。さらに、5%デンプンを炭素源とした条件においては、野生株と比較して全ての破壊株で活性の増加が認められ、特に $\Delta creA \Delta creB$  では 72 時間の時点で野生株と比較して約 7 倍高い活性を示した (Fig. 1-2 B)。

#### 1-3-3) バイオマス分解酵素生産培地における生育

麹菌はアミラーゼ系酵素遺伝子だけではなく、セルロース系バイオマス分解酵素遺伝子も多数有しており、これらの酵素遺伝子も CCR を受けることが知られている。実験 1-3-1) 及び 1-3-2) の結果から、*creA* 及び *creB* 破壊株は野生株と比較して高い $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示すことが明らかになったものの、 $\alpha$ -アミラーゼ以外の多糖類分解酵素も同様に高生産できるかは不明である。そこで、バイオマス分解酵素の生産性を解析することで、*creA* 及び *creB* 破壊が多様な酵素の高生産に効果があるか検証した。

バイオマス分解酵素生産培地として、YP 液体培地にバイオマス分解酵素遺伝子の発現誘導基質であるキシロースを添加した培地を用いた。まずバイオマス分解酵素生産培地における各破壊株の生育を比較するために、1%キシロースまたは 5%キシロースを含む培地で培養して得られた菌体の乾燥菌体重量を測定した。その結果、1%キシロース培地では全ての破壊株は野生株と同等の生育を示した。一方、5%キシロース培地では興味深いことに野生株と $\Delta creB$  は 1%キシロース培地と比較して生育が著しく悪化するのに対し、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA \Delta creB$  ではキシロース濃度の違いによる生育への影響は観察されなかった (Fig. 1-3 A)。

#### 1-3-4) キシロース資化関連遺伝子の転写制御因子 XlnR の発現解析

キシロース資化に関与する遺伝子の発現は、転写因子 XlnR によって制御される。しかし、麹菌において XlnR は CreA による制御を受けるかは明らかになっていない。そ

こで、1%キシロース及び5%キシロースを含む YP 液体培地における各破壊株における *xlnR* の発現量を定量 PCR により解析した結果、野生株及び  $\Delta creB$  では 1%キシロース培地と比較して 5%キシロース培地において *xlnR* の発現量が著しく低下した。一方、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では炭素源濃度による発現量の変化はなく、*xlnR* の発現量は野生株よりも高い値を示した (Fig. 1-3 B)。

#### 1-3-5) キシラナーゼ生産性

麹菌はキシラナーゼやセルラーゼなどのバイオマス分解酵素を菌体外に分泌生産する。そこでまず、*creA* 及び *creB* 遺伝子破壊株はバイオマス分解酵素生産培地においてどのようなタンパク質が分泌生産されるか解析するために、5%キシロースを含む YP 液体培地で 48 時間培養して得られた培養上清を SDS-PAGE 解析に供した。その結果、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  において 20 kDa 付近にキシラナーゼと思われるバンドが濃く観察された (Fig. 1-4 A)。そこで、実際に培養上清中のキシラナーゼ活性を測定した結果、野生株と比較して  $\Delta creB$  では僅かに活性が上昇したのに対して、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では野生株及び  $\Delta creB$  よりも非常に高い活性を示し、特に  $\Delta creA\Delta creB$  では野生株と比較して 100 倍以上も高い活性を示した (Fig. 1-4 B)。さらに、麹菌は多数のキシラナーゼ遺伝子を有しており、その中で発現量が非常に高いキシラナーゼ遺伝子 *xynG2* の発現量を定量 PCR により解析した。その結果、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では野生株よりも顕著に高い発現量を示した。一方、 $\Delta creB$  は野生株と比較して僅かに発現量が増加していた (Fig. 1-4 C)。

#### 1-3-6) $\beta$ -グルコシダーゼ及びセルラーゼ生産性

*creA* 及び *creB* 遺伝子破壊はキシラナーゼに加えて他のバイオマス分解酵素の高生産化にも効果があるか解析するために、 $\beta$ -グルコシダーゼ及びセルラーゼの生産性を解析した。まず 5%キシロースを含む YP 液体培地における  $\beta$ -グルコシダーゼの活性を測定した結果、全ての破壊株で野生株よりも活性が増加しており、特に  $\Delta creA\Delta creB$  では顕著に高い活性を示した (Fig. 1-5 A)。麹菌はキシラナーゼ遺伝子と同様に複数の  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子を有しており、その中でも発現量が高い *bglC* の発現量を定量 PCR により解析した。その結果、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では野生株よりも顕著に発現量が増加

しており、一方 $\Delta creB$  は野生株と比較して高い発現量を示すものの、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  より *bglC* の発現量は低かった (Fig. 1-5 B)。次にセルラーゼ生産性を同様にして測定した結果、全ての破壊株で活性の上昇は認められず、野生株とほぼ同等の活性を示した (Fig. 1-5 C)。

#### 1-3-7) 小麦フスマを用いた固体培養における酵素生産性

麹菌は小麦フスマなどを用いた固体培養の方が液体培養と比較して酵素生産性が高いことが知られており、さらに固体培養では CCR を誘導するグルコースなどの基質が液体培養よりも培地中に拡散しづらいため、CCR による遺伝子発現抑制をほとんど受けないことが報告されている (Vinięra-González and Favela-Torres, 2006)。そこで、液体培養と同様に固体培養においても、*creA* 及び *creB* 破壊は酵素生産性の向上に効果があり、野生株よりも高い酵素生産性を示すのか解析するために、小麦フスマ培地において 48 時間培養して得られた粗酵素液を用いて、 $\alpha$ -アミラーゼ、キシラナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ及びセルラーゼ活性を測定した。その結果、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では $\alpha$ -アミラーゼ及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性が野生株よりも増加した (Fig. 1-6 B, D)。一方、キシラナーゼ及びセルラーゼ活性は全ての破壊株で野生株とほぼ同等の活性を示した (Fig. 1-6 A, C)。

#### 1-4) 考察

CCR 関連因子遺伝子 *creA* 及び *creB* の単独及び二重破壊株では CCR が解除され、1% デンプンを含む YP 培地において野生株と比較して $\alpha$ -アミラーゼ生産性が向上することをこれまでに明らかにした。そこで本章では、これらの破壊株が多様な培養条件下において $\alpha$ -アミラーゼに加えてバイオマス分解酵素も高生産できるか解析した。

まず、高濃度の炭素源条件下においても CCR が解除され、 $\alpha$ -アミラーゼが高生産できるか解析した。5%マルトース培地では1%マルトース培地と比較して、マルトースの分解産物であるグルコースの蓄積量が多いため、野生株では CCR を受けて1%マルトース培地と比較して5%マルトース培地の方が $\alpha$ -アミラーゼ活性が低下した (Fig. 1-1 B)。一方、 $\Delta creA$ 、 $\Delta creB$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  は炭素源の濃度による $\alpha$ -アミラーゼ活性への影響はなく、両培地で野生株よりも高い活性を示したことから、高濃度の炭素源条件下にお

いても *creA* 及び *creB* 遺伝子破壊により CCR は解除され、 $\alpha$ -アミラーゼの高生産が可能であることが明らかになった (Fig. 1-1 C)。

さらに、5%マルトース培地と同様に 5%グルコース及び 5%デンプンを含む培地においても、全ての破壊株で野生株よりも高い $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示した。特に  $\Delta creA\Delta creB$  は炭素源の濃度及び種類に依存せず、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creB$  よりも顕著に高い $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示し、5%デンプン培地において 72 時間培養した条件では、 $\Delta creA\Delta creB$  は野生株よりも約 7 倍高い活性を示した (Fig. 1-2 B)。以上の結果より、*creA* 及び *creB* の二重破壊は多様な培養条件における $\alpha$ -アミラーゼの高生産に顕著な効果があることが示された。

$\Delta creA\Delta creB$  が  $\Delta creA$  及び  $\Delta creB$  より高い $\alpha$ -アミラーゼ活性を示した要因として、CreB が重要な働きをしていることが予想された。その理由として、 $\Delta creB$  は  $\Delta creA$  と同等の高い $\alpha$ -アミラーゼ活性を示すのに対して、 $\Delta creB$  の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* の発現量は野生株よりも高いものの  $\Delta creA$  と比較して著しく低い値を示した。このことから、CreB は $\alpha$ -アミラーゼ生産において CreA とは異なり転写制御ではなく転写後の制御に関与していることが示唆された。しかし、CreB の制御下にある因子は未だに明らかとなっておらず、本博士論文研究においても同定するまでには至らなかった。今後は麹菌において CreB の制御下因子を同定し、CreB による CCR 制御機構を明らかにすることで  $\Delta creA\Delta creB$  以上の酵素高生産株の構築が期待できる。

$\alpha$ -アミラーゼ以外の酵素としてバイオマス分解酵素の生産性を解析するために、バイオマス分解酵素生産の誘導基質であるキシロースを炭素源とした培地で培養した。その結果、非常に興味深いことに野生株及び  $\Delta creB$  では 1%キシロース培地と比較して 5%キシロース培地において生育の悪化及び転写因子 XlnR の発現量の著しい低下が観察された。一方  $\Delta creA$  及び  $\Delta creA\Delta creB$  では炭素源濃度による生育及び *xlnR* の発現量への影響は観察されず、さらに野生株よりも高い *xlnR* 発現量を示したことから、高濃度のキシロース培地において CreA は XlnR の発現を抑制することが示唆された。麹菌において XlnR は 75 遺伝子を正に制御することが報告されており、その中にはキシロース代謝に関与する遺伝子に加えて、*A. nidulans* のキシローストランスポーター遺伝子 *xtrD* のオーソログ遺伝子 (AO090001000069) も含まれていた (Noguchi *et al.*, 2009)。そのため、5%キシロース培地において野生株及び  $\Delta creB$  は CreA によって XlnR の発現が抑制され



たことでキシロース資化が抑制され、生育が悪化したことが示唆された。

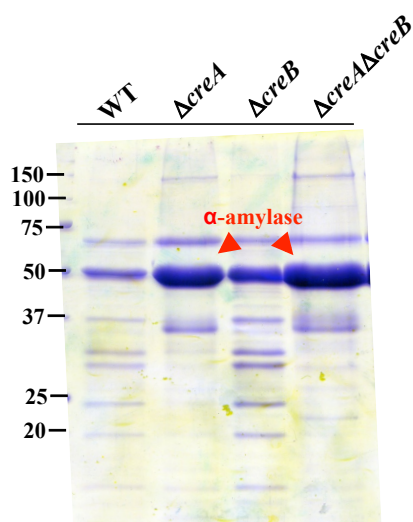
以上の結果から CreA はキシロース濃度依存的に XlnR の発現を抑制し、さらにキシロースはバイオマス分解酵素生産を誘導すると同時に、CreA による CCR を誘導する基質として機能することが明らかになった。グルコースもキシロースのように CCR を誘導する一方で、アミラーゼ生産の誘導基質であるデンプンやマルトースと同様にアミラーゼ系酵素遺伝子の転写因子 AmyR の核移行を誘導する (Suzuki *et al.*, 2015)。しかし、グルコース存在条件下では CreA がアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に存在する CreA 結合配列に結合するため、AmyR は核へ移行してもアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域への結合を CreA によって阻害され、アミラーゼ遺伝子の発現は CreA による抑制を受けた状態になる (Ruijter and Visser J, 1997)。一方、*creA* を破壊すると AmyR がアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域へ結合できるようになり、グルコースでもアミラーゼ生産が誘導される (Fig.1-2 A)。このグルコースによる CCR の誘導は、キシロースとは異なり 1%グルコース培地でも誘導されることから (Ichinose *et al.*, 2014)、CreA は炭素源の種類によって CCR を誘導する速度が異なることが考えられた。今後は炭素源の種類及び濃度の違いによって CreA の挙動がどう変化するのか解析することで、CreA による CCR 制御メカニズムについて理解を深めていきたい。

また、バイオマス分解酵素の生産性を解析した結果、 $\alpha$ -アミラーゼと同様に  $\Delta creA \Delta creB$  ではキシラナーゼ及び $\beta$ -グルコシダーゼの生産性が野生株、 $\Delta creA$  及び  $\Delta creB$  よりも顕著に高い値を示すことがわかった (Fig. 1-4 B; Fig. 1-5 A)。このことから、*creA* 及び *creB* の二重破壊は麹菌が生産する多様な酵素の生産性の向上に効果があることが明らかとなった。しかし、セルラーゼは全ての破壊株において生産性の向上が認められなかったことから、セルラーゼは CreA 及び CreB による CCR 制御を受けないことが示唆された (Fig. 1-5 C)。これまでに麹菌及び *A. nidulans* において、PkaA (cAMP-dependent Protein kinase) はセルラーゼの CCR 制御に関与し、*pkaA* 破壊株ではセルラーゼ生産性が向上することが報告されている (小川ら, 2015)。*T. reesei* においても、Pka1 (cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit 1) 及び Acy1 (adenylate cyclase) がセルラーゼ遺伝子の発現制御に関与していることから、セルラーゼの生産は CreA 及び CreB 非依存的な CCR 制御を受けることが示唆されている (De Assis *et al.*, 2015; Schuster *et al.*, 2012)。

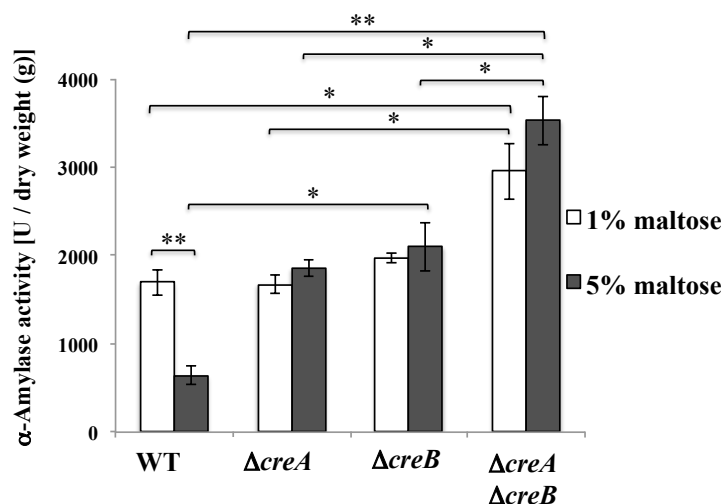
固体培養では、CCR をほとんど受けないことが報告されており (Viniegra-González and Favela-Torres, 2006)、本研究でもキシラナーゼ及びセルラーゼ生産性は *creA* 及び *creB* 破壊の影響を受けず、全ての破壊株で野生株とほぼ同等の生産性を示した (Fig. 1-6)。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼ及び $\beta$ -グルコシダーゼは、 $\Delta creA$  及び $\Delta creA\Delta creB$  において生産性が向上したことから、固体培養においては酵素によって CreA 及び CreB の制御を受けるものと受けないものがあることが示唆された。麹菌のグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* やチロシナーゼ遺伝子 *melB* は、固体培養特異的に発現することが知られており (Hata *et al.*, 1998; Obata *et al.*, 2004)、 $\Delta creA$  ではキシラナーゼのように液体培養と固体培養によって酵素生産性が異なるものがあることから、CreA は培養条件によって遺伝子の発現制御を変化させることが示唆された。今後はマイクロアレイ解析により網羅的な転写解析を行い、液体培養と固体培養間での CreA による遺伝子発現制御機構の違いを明らかにすることで、固体培養においてさらに酵素高生産が可能な株を構築できると考えられる。

1-5) 図表

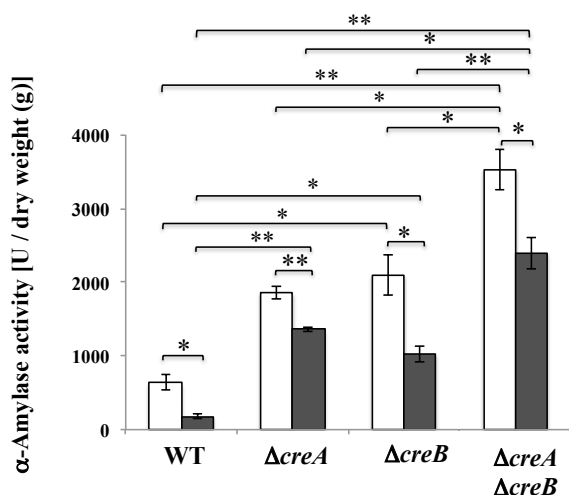
(A)



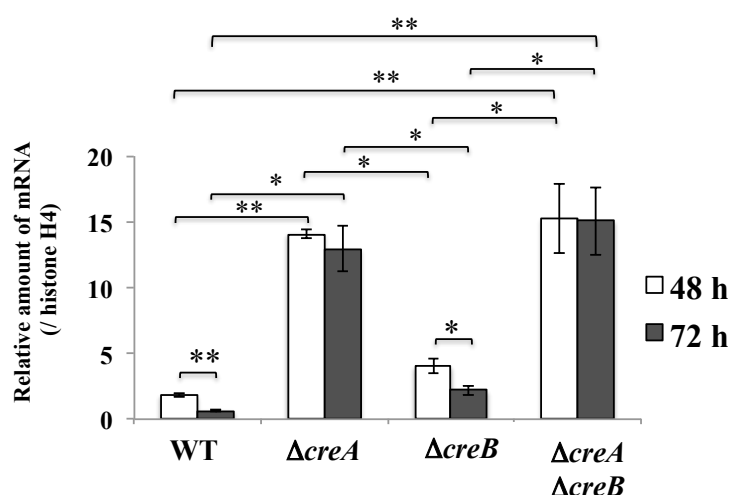
(B)



(C)

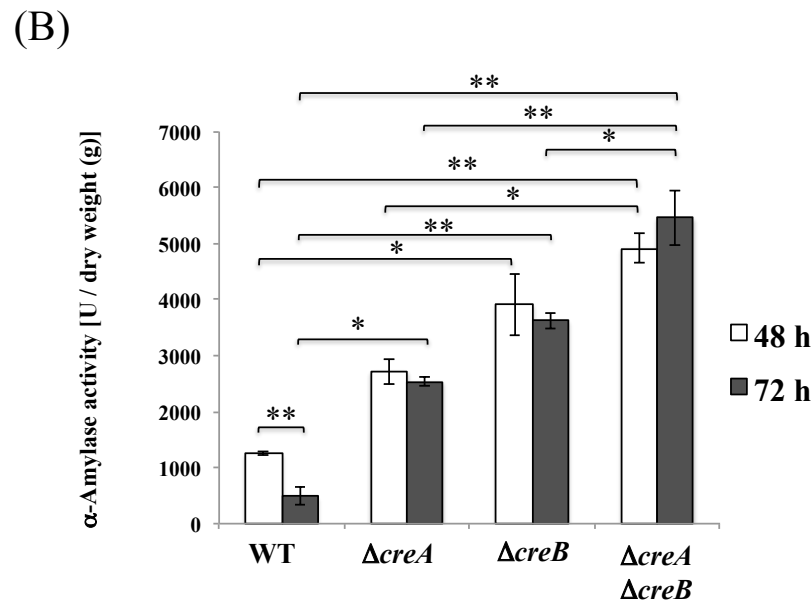
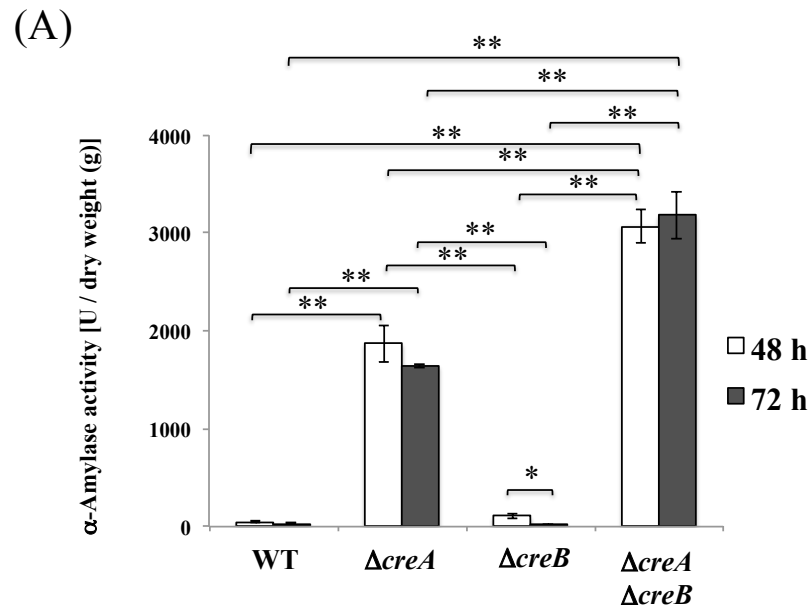


(D)



**Fig. 1-1 α-Amylase production level.**

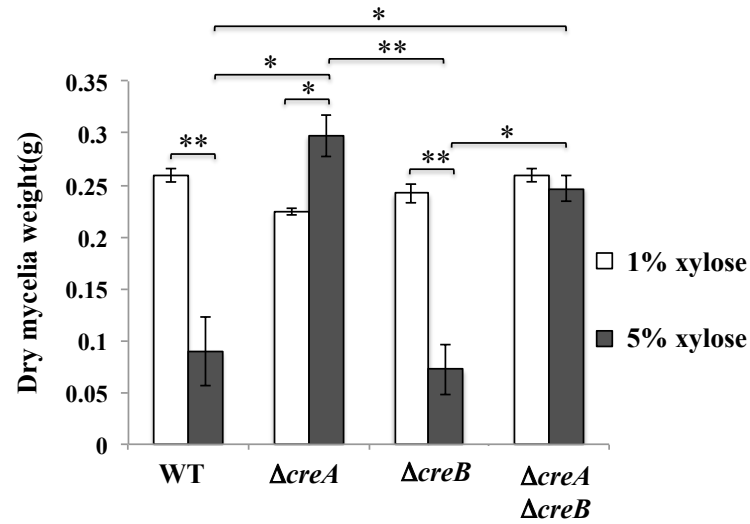
Each strain was grown in liquid YP medium containing 5% maltose for 48 h (A), 1% or 5% maltose for 48h (B), or 5% maltose (C, D). The culture broth and cell wall-absorbed fraction were mixed and subjected to SDS-PAGE analysis (A). α-Amylase activities were measured and total activity was divided by dry mycelia weight (B, C). Expression levels of *amyB* gene were measured by quantitative RT-PCR (D). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's t test and Tukey-Kramer method)



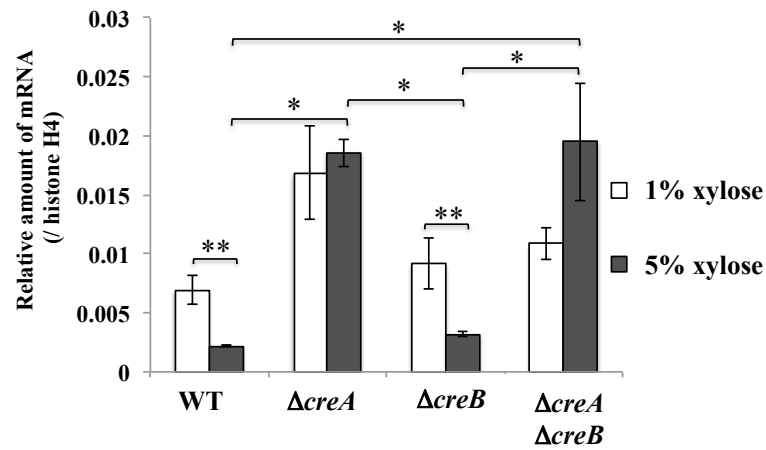
**Fig. 1-2  $\alpha$ -Amylase production level.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 5% glucose (A) or 5% starch (B), and the  $\alpha$ -amylase activities were measured, and total activity was divided by dry mycelia weight. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01; Student's  $t$  test and Tukey-Kramer method)

(A)

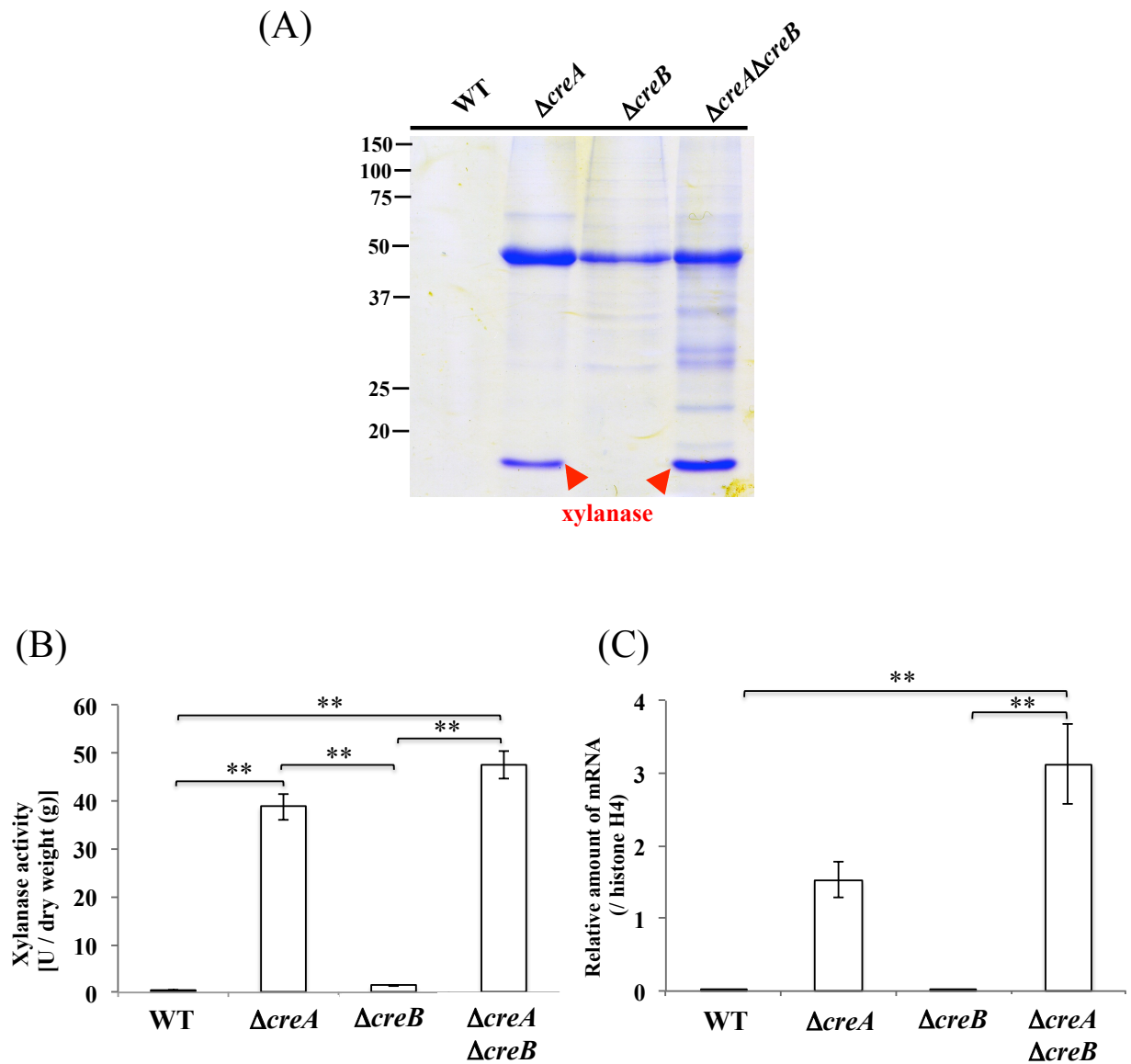


(B)



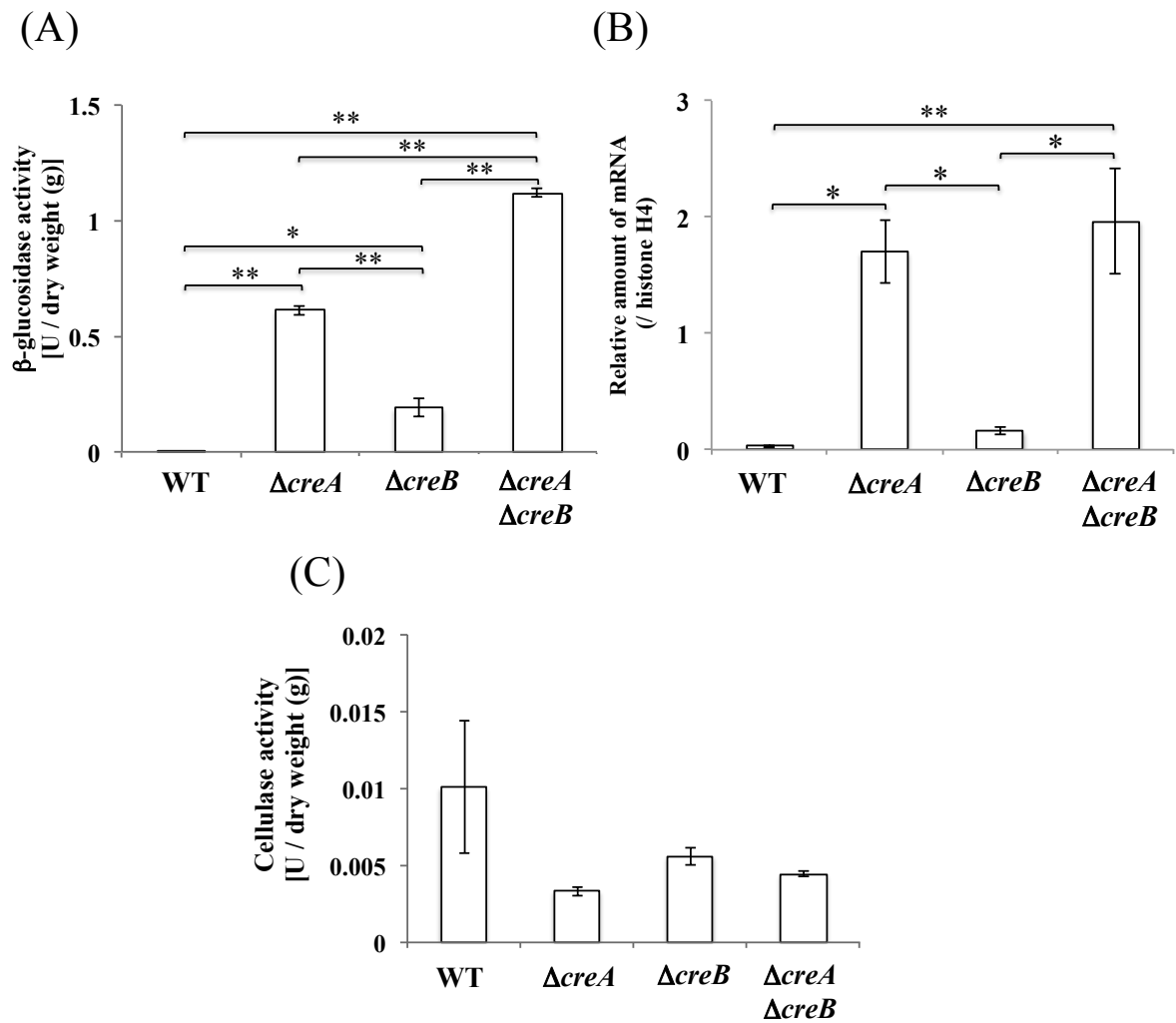
**Fig. 1-3 Growth and *xlnR* expression level**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% or 5% xylose for 48 h and dry mycelia weight was measured (A). Expression levels of *xlnR* gene were measured by quantitative RT-PCR (B). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's *t* test and Tukey-Kramer method)



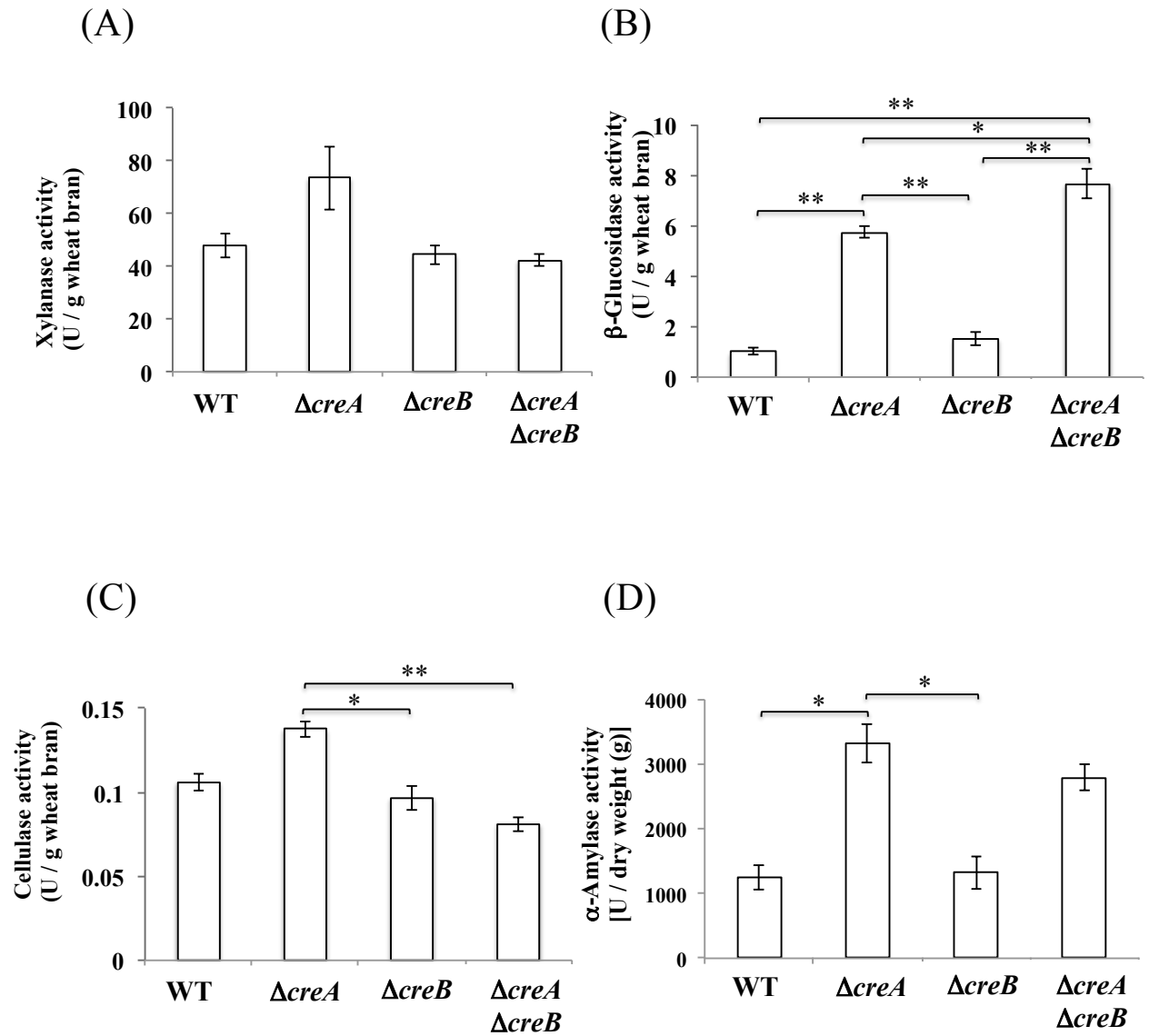
**Fig. 1-4 Xylanase production level.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 5% xylose for 48 h. Culture broth and cell wall-absorbed fraction were mixed and subjected to SDS-PAGE analysis (A). Xylanase activity was measured and total activity was divided by dry mycelia weight (B). Expression levels of *xynG2* gene were measured by quantitative RT-PCR (C). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\*\* $p < 0.01$ ; Tukey-Kramer method)



**Fig. 1-5  $\beta$ -glucosidase and cellulase production levels.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 5% xylose for 48 h.  $\beta$ -glucosidase (A) and cellulase (C) activities were measured, and total activity was divided by dry mycelia weight. Expression levels of *bglC* gene were measured by quantitative RT-PCR (B). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01; Tukey-Kramer method)



**Fig. 1-6 Various enzymes production level in solid-state culture.**

Each strain was grown in solid-state culture with wheat bran as substrate for 48 h, and xylanase (A),  $\beta$ -glucosidase (B), cellulase (C), and  $\alpha$ -amylase (D) activities were measured. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars.

(\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01; Tukey-Kramer method)



## 第2章

### カーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による液体培養時の菌糸形態の制御

#### 2-1) 緒言

麹菌は液体培養よりも小麦フスマやコメなどを用いた固体培養において多様な酵素を高生産することから、清酒や味噌の製造においても麹菌は固体培養によって培養されている。しかし、固体培養と比較して液体培養の方が培養の制御や管理が簡便であることから、液体培養でも固体培養と同様に酵素を高生産できる培養条件及び菌株の造成が求められている。

第1章において $\Delta creA$ を液体培地及び固体培地で培養し、様々な酵素生産性を解析した結果、野生株は液体培養よりも固体培養の方が $\alpha$ -アミラーゼやキシラナーゼの生産性が顕著に高かったのに対し、 $\Delta creA$ は固体培養と同様に液体培養においても高い酵素生産性を示した。その要因として、 $\Delta creA$ ではCCRが解除されるのに加えて、液体培養において野生株よりも生育が良くなることが挙げられた。これまでに糸状菌において $creA$ 変異株は寒天培地上で生育が著しく悪化することが報告されており、この生育の悪化は $creA$ 変異株を産業利用する上で問題視されていた。しかし、液体培地では $\Delta creA$ は野生株よりも良い生育を示すことから、 $creA$ 破壊は液体培地における菌体量の増加に効果があることが示唆された。

さらに興味深いことに液体培養時の菌糸形態を観察した結果、野生株では菌糸がからまり合いペレット状の形態を示すのに対し、 $\Delta creA$ では菌糸が培地中に分散することでパルプ状に菌糸形態が変化することが観察された。糸状菌の細胞壁はキチンや $\beta$ -グルカン、 $\alpha$ -グルカンなどの多糖によって構成されており、キチン合成酵素遺伝子や $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子を欠損させると、生育や孢子形成などに異常が生じることが明らかになっている (Fukuda *et al.*, 2009; Dichtl *et al.*, 2015)。さらに、 $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子である $agsB$ 破壊株では、寒天培地における生育への影響は観察されないものの、液体培養時には $\Delta creA$ と同様にパルプ状の菌糸形態を示し、パルプ状に菌糸形態が変化することで菌体量が野生株よりも増加することが報告されている (Zhang *et al.*, 2017; Miyazawa *et al.*, 2016)。このことから、液体培養における $\Delta creA$ の菌体量の増加は菌糸形態の変化によるものであることが予想され、さらに $\Delta creA$ において細胞壁の構成成分

が変化している可能性が考えられた。これまでに他の糸状菌において、*creA* 変異株は液体培養時に菌糸形態が変化するという報告はなく、*creA* 破壊は CCR の解除に加えて液体培養において菌体量の増加に効果があることが考えられた。そこで本章では、*creA* 破壊株における菌糸形態の変化の要因を解明することを目的とした。

## 2-2) 実験方法

### 2-2-1) 菌株

本章で使用した菌株を以下に記した。*ΔligD::loxP pyrG::niaD* 株を野生株として使用し

Table 2-1 Strain

strain	Genotype	Reference
<i>ΔligD::loxP pyrG<sup>-</sup></i>	<i>ΔligD::loxP; sC<sup>-</sup>; niaD<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup></i>	Mizutani <i>et al.</i> (2012)
<i>ΔligD::loxP pyrG::niaD</i>	<i>ΔligD::loxP; pyrG<sup>+</sup>; niaD<sup>+</sup>; sC<sup>-</sup></i>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
<i>ΔcreA</i>	<i>ΔligD::loxP; ΔcreA::sC; pyrG<sup>+</sup>; niaD<sup>+</sup></i>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
<i>ΔcreB</i>	<i>ΔligD::loxP; ΔcreB::pyrG; sC<sup>-</sup>; niaD<sup>-</sup></i>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
<i>ΔcreA pyrG<sup>-</sup></i>	<i>ΔligD::loxP; ΔcreA::sC; niaD<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup></i>	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
<i>ΔamyD</i>	<i>ΔligD::loxP; ΔamyD::pyrG; sC<sup>-</sup>; niaD<sup>-</sup></i>	This study
<i>ΔcreAΔamyD</i>	<i>ΔligD::loxP; ΔcreA::sC; ΔamyD::pyrG; niaD<sup>-</sup></i>	This study
<i>PenoA-amyD (amyD o/e)</i>	<i>ΔligD::loxP; PenoA-amyD; pyrG<sup>+</sup>; niaD<sup>+</sup>; sC<sup>-</sup></i>	This study

た。

### 2-2-2) PCR プライマー

本章で使用した PCR プライマーを以下に示した。

Table 2-2 Nucleotide sequences of primers

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
amyD up sen	TACACCAAGCAGACTTAGGG
amyD up anti AnpyrG	GAGCCCAAGGCGCTGCAGCAGG AGTAATTCCGGTGGATCC
amyD down sen AnpyrG	GCGGGGATGGAGATCTCGACCTGATCGCGAAACTAAATACC
amyD down anti	TATTGCCCAAGCAGACTAC
AnpyrGsen	GGTCGAGATCTCCATCCCCGCAAACCTAC
AnpyrGantiPstI	CCTGCTGCAGCGCCTTGGGCTCATATAAC
amyD sen not	TCGAGCGGCCGCAATTACTCCCGCGACCATGG
amyD anti sph	TCGAGCATGCTGCCCCAAGCAGACTACAAC
RT-agsA Fw	CATTGCGGCCAACTCATAC
RT-agsA Rv	GTAAACACCGCTTCCCACA
RT-agsB Fw	CGTCTATTCTCTGGTGGCTTG
RT-agsB Rv	CAATAACATAGGCGGACTGGA
RT-agsC Fw	ACGTGTGCTTCGTTCTGTTG
RT-agsC Rv	GGCCTATTAAGCTGCTCACG
amyD qRT-PCR sen	ACAAGCTCGATCCGAACCTAC
amyD qRT-PCR anti	TGCCCTGAGTAGACAAGAG

Table 2-2 Nucleotide sequences of primers

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
amyG090003001497 qRT-PCR sen	GGTGCTCCTCCGTAAAGATG
amyG090003001497 qRT-PCR anti	TGTTCCCCGTAAGCATAACAG
chsA qRT-PCR sen	TTCGCCCCATTGTCAATAC
chsA qRT-PCR anti	TGCACAATGGAGAAGTAGAG
chsB qRT-PCR sen	TTTCCGTACCCGTCTTGTG
chsB qRT-PCR anti	AGGAGAGCCTGGAAGAAACG
chsC qRT-PCR sen	TGATCCCTGGCATATGTTT
chsC qRT-PCR anti	TTGGTACCCCATGTGATATC
chsD qRT-PCR sen	TAAGGATCCCGAGGTCATG
chsD qRT-PCR anti	ACAGGTCACACCACCAAAG
csmA 090026000323 qRT-PCR sen	ACCTGTATCCAACCTGTTTCG
csmA 090026000323 aRT-PCR anti	TGAGGGCCTGAAGACCATAG
csmB qRT-PCR sen	ACGCTCTTGCCAATAATCTG
csmB qRT-PCR anti	ACCGAGGAATACTGGGAATG
fksA qRT-PCR sen	ACGCTATTGCCGTTATCATC
fksA qRT-PCR anti	TAGACGAAACGCTGGATTG
gelA qRT-PCR sen	ACGATGGCAAGGTTAAGAC
gelA qRT-PCR anti	ACCACCGGTCTTGTTGTAG
gelB qRT-PCR sen	ACAACCTGCAGAAGCAGTAC
gelB qRT-PCR anti	AAGGTACCGTTCTTGATCAG
gfaA 090003000003 qRT-PCR sen	TGATTCTTACGAGGGACAAC
gfaA 090003000003 qRT-PCR anti	TCGACAGTCTTTGGAAC TTC
niaD primer	GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC

## 2-2-3) 培地

## ・ YPM 培地

0.5% Bacto<sup>TM</sup> yeast extract, 1% Bacto<sup>TM</sup> peptone, 1% maltose

寒天培地を作製する際は、各培地に 1.5% 寒天を加えた。

## 2-2-4) 液体培地における菌糸形態の観察

200 ml 三角フラスコに 50 ml の YPM 液体培地を作製し、各菌株の分生子を  $2 \times 10^6$  個植菌し、30℃、120 rpm で 24 時間振とう培養した。

## 2-2-5) 薬剤感受性試験

200 µg/ml Congo Red または 30 µg/ml Calcofluor white を含む YPM 寒天培地に、各菌株の分生子を  $10^4 \sim 10^6$  個植菌し、30℃で 2 日間培養した。

## 2-2-6) 細胞壁構成成分の解析

### (1) 熱水・アルカリ処理による細胞壁成分の分画

液体培養して得られた菌体を凍結乾燥させ、凍結乾燥菌体を乳鉢及び乳棒により粉碎した。破碎した菌体 0.5 g を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 40 ml に懸濁し、121℃で 1 時間オートクレーブにかけることで熱水抽出を行った。8,000 g、4℃で 15 分間遠心し、上清を熱水可溶画分 (Hot water-soluble fraction; HW) として回収し、沈殿は再び 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 40 ml に懸濁し、同様に熱水抽出操作を行った。遠心して得られた熱水可溶画分は回収し、沈殿は 2 N NaOH 50 ml に懸濁して 4℃で 24 時間攪拌することでアルカリ抽出操作を行った。8,000 g、4℃で 15 分間遠心し、上清をアルカリ可溶性画分 (Alkali-soluble fraction; AS)、沈殿をアルカリ不溶性画分 (Alkali-insoluble fraction; AI) として回収し、AS 画分と脱塩水に懸濁した AI 画分は酢酸を用いて pH 7 前後に中和した。全ての画分を脱塩水に対して室温で 6 時間以上透析する操作を 3 回行い、AS 画分は 8,000 g、4℃で 15 分間遠心し、上清を AS1 画分、沈殿を AS2 画分として回収した。得られた全ての画分は凍結乾燥して水分を除去し、乾燥重量を測定することで回収率及び重量比を計算して求めた。

### (2) 細胞壁構成多糖の成分解析

凍結乾燥させた各画分 10 mg を 25 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 µl に完全に溶解させ、4℃に 16 時間以上静置した。終濃度 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> となるように蒸留水 4.8 ml を加えて混合した後、100℃に 12 時間以上静置して加水分解させた。炭酸バリウムを用いて中和した後、6,000 g、4℃で 10 分間遠心して上清を回収した。得られた上清中に含まれる炭水化物の組成を Yoshimi らによって報告された方法 (Yoshimi *et al.*, 2013) に従って解析した。

## 2-2-7) α-グルカンの分子量解析

α-グルカンの分子量の解析には、配位子交換クロマトグラフィー用カラム (Shodex Column Sugar KS-805, 8×300 mm)、ガードカラム SUGAR KS-G、示差屈折検出器 FLC-10 (シマムラテック)、解析ソフト HY-PCR を用い、溶離液を 1M NaOH としてカラム温

度 35°C、流速 1 ml/min で 25 分間の設定で解析を行なった。尚本解析は応用微生物学分野に依頼した。

## 2-3) 実験結果

### 2-3-1) *creA* 破壊による液体培養時の生育への影響

糸状菌において *creA* 変異株は野生株と比較して生育が悪化することが知られており、麴菌の *creA* 破壊株においても同様に寒天培地上で生育が悪化することが観察された (Fig. 2-1 A)。しかし、これまでに液体培養時に *creA* 変異により生育へどのような影響を及ぼすのかは全く知られていない。そこで、野生株及び、 $\Delta creA$ 、*creA* 相補株、 $\Delta creB$  を YPM 液体培地で 24 時間及び 48 時間培養し、得られた菌体の乾燥菌体重量を測定することで生育を比較した。その結果、24 時間の時点では全ての株間で菌体量に差は認められなかったのに対し、48 時間の時点では  $\Delta creA$  は野生株、*creA* 相補株 ( $\Delta creA + creA$ ) 及び  $\Delta creB$  よりも菌体量が増加しており、野生株と比較して約 1.3 倍の菌体重量を示した (Fig. 2-1 B)。

### 2-3-2) 液体培養時の菌糸形態の観察

$\Delta creA$  が液体培養において野生株よりも生育が良くなる原因を解明するために、まず液体培養時の菌糸形態に着目した。これまでに菌糸形態を変化させることで菌体量が増加することが報告されており (Miyazawa *et al.*, 2016)、 $\Delta creA$  においても液体培養時に菌糸形態が変化している可能性が考えられた。そこで、 $\Delta creA$  を YPM 液体培地で培養した時の菌糸形態を観察した結果、野生株、 $\Delta creB$  及び *creA* 相補株では菌糸が絡まり合いペレット状の菌糸形態を示すのに対し、 $\Delta creA$  では菌糸が液体培地中に分散したことでパルプ状の菌糸形態を示した (Fig. 2-2)。

### 2-3-3) 薬剤感受性試験

麴菌の細胞壁構成多糖である  $\alpha$ -グルカンの生合成遺伝子 *agsB* 破壊株は、 $\Delta creA$  と同様に液体培養時にパルプ状の菌糸形態を示すことが報告されている (Zhang *et al.*, 2017)。このことから、 $\Delta creA$  においても細胞壁構成多糖に変化が生じている可能性が考えられた。そこで、*agsB* 破壊株は細胞壁ストレスを誘発する薬剤である calcofluor white 及び

Congo Red に感受性を示すことから、 $\Delta creA$  においてもこれらの薬剤に対して感受性を示すか解析した。30  $\mu\text{g/ml}$  caco fluor white または 200  $\mu\text{g/ml}$  Congo Red を含む YPM 寒天培地を用いて各薬剤への感受性を観察した結果、 $\Delta creA$  は野生株及び *creA* 相補株と同様に薬剤へ感受性を示さなかった (Fig. 2-3)。

#### 2-3-4) 細胞壁構成多糖の成分解析

実験 2-3-3) の結果から、 $\Delta creA$  の菌糸形態の変化は細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量の減少によるものではない可能性が考えられた。そこで、実際に *creA* 破壊によって細胞壁構成多糖に変化が生じているか解析するために、 $\Delta creA$  の細胞壁多糖の成分解析を行なった。実験方法 2-2-6) に従って細胞壁を 4 つの画分 (HW、AS1、AS2 及び AI) に分画し、各画分の重量を測定した結果、HW 及び AS1 の重量は野生株と  $\Delta creA$  間でほとんど差が認められなかったものの、 $\alpha$ -グルカンを含む AS2 画分の量が  $\Delta creA$  では野生株よりも減少していた。一方、キチン及び $\beta$ -グルカンを含む AI 画分の量は  $\Delta creA$  の方が野生株よりも多かった (Fig. 2-5 A)。次に各画分中に含まれる糖の成分解析を行なった結果、HW 及び AS1 画分中に含まれる糖の量は非常に少量であり、野生株と  $\Delta creA$  でほぼ同等の値を示した。また、AI 画分に含まれるキチン由来のグルコサミン及び $\beta$ -グルカン由来のグルコース量は、野生株と  $\Delta creA$  間で差が認められなかった。一方、AS2 画分に含まれる $\alpha$ -グルカン由来のグルコース量は、 $\Delta creA$  では野生株と比べて約 2 倍増加していた (Fig. 2-5 B)。

#### 2-3-5) $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の発現解析

麹菌における $\alpha$ -グルカンの合成には、 $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsA*、*agsB* 及び *agsC* が関与しており、特に *agsB* が $\alpha$ -グルカン合成において重要な働きをしていることが報告されている (Zhang *et al.*, 2017)。実験 2-3-4) の結果から、 $\Delta creA$  では細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量が増加していることが示唆されたため、 $\Delta creA$  では $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の発現量に変化している可能性が考えられた。そこで、定量 PCR により  $\Delta creA$  における $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の発現量を解析した結果、*agsA* 及び *agsC* の発現量は野生株と  $\Delta creA$  間でほとんど差が認められなかったのに対し、*agsB* の発現量は  $\Delta creA$  において野生株よりも約 10 倍高かった (Fig. 2-6)。

#### 2-3-6) 細胞壁構成多糖の合成に関与する遺伝子の発現解析

麹菌の細胞壁は $\alpha$ -グルカン以外にもキチンや $\beta$ -グルカンによって構成されている。実験 2-3-4) の結果から、キチンや $\beta$ -グルカンを含む AI 画分中のグルコースやグルコサミンなどの糖の量は野生株と $\Delta creA$  間で差が認められなかったものの、 $\Delta creA$  の AI 画分の重量は野生株よりも高い値を示した。そこで、CreA が $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子と同様にキチンや $\beta$ -グルカン合成に関与する遺伝子の発現制御にも関与しているか解析するために、 $\Delta creA$  においてキチン合成酵素遺伝子(*chsA*, *chsB*, *chsC* *chsD*, *csmA* 及び *csmB*)、 $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子(*fksA*)、 $\beta$ -1,3-glucanosyl transferase 遺伝子 (*gelA*, *gelB*)、glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 遺伝子 (*gfaA*) の発現量を定量 PCR により解析した。その結果、 $\Delta creA$  において *chsB* 及び *gelB* の発現量が野生株よりも低下していたものの、他の遺伝子は野生株とほぼ同等の発現量を示した (Fig. 2-7)。

#### 2-3-7) $\alpha$ -グルカンの合成及び分解に関与する遺伝子クラスターの発現解析

*Aspergillus wentii* の細胞壁中の $\alpha$ -グルカンは、約 100 個の $\alpha$ -1,3 結合のグルコースとそれに結合した数個の $\alpha$ -1,4 結合のグルコース鎖を 1 ユニットとしたものが、約 25 ユニット直鎖状に連結されたもので構成されており、AgsB は $\alpha$ -グルカン内の $\alpha$ -1,3 結合のグルコース鎖の合成に関与することが知られている (Choma *et al.*, 2013)。近年では、AgsB とクラスターを形成する 2 つの  $\alpha$ -アミラーゼ様酵素 AmyD 及び AmyG も $\alpha$ -グルカンの制御に関与していることが明らかとなり、AmyG は $\alpha$ -1,4 結合のグルコース鎖の合成に関与するのに対し、AmyD は *Aspergillus niger* における AmyD オーソログの AgtA が  $\alpha$ -1,4-glucanotransferase 活性を有していることから、 $\alpha$ -グルカン中の $\alpha$ -1,4 結合の切断に関与すると予想されている (He *et al.*, 2014; van der Kaaij *et al.*, 2007)。麹菌においても *A. nidulans* や *A. niger* と同様にクラスターが保存されていたことから、AmyD と AmyG は麹菌の $\alpha$ -グルカンの分解及び合成に関与している可能性が考えられた。そこで、AmyD 及び AmyG が $\Delta creA$  の菌糸形態の変化に関与するか明らかにするために、 $\Delta creA$  における *amyD* 及び *amyG* の発現量を定量 PCR により解析した結果、 $\Delta creA$  における *amyG* の発現量は野生株とほぼ同等の値を示すのに対し、*amyD* の発現量は野生株よりも約 50 倍高かった (Fig. 2-8)。

#### 2-3-8) *amyD* 遺伝子の破壊株及び高発現株の作製

実験 2-3-7)の結果から、 $\Delta creA$  では *amyD* が高発現したことで菌糸形態が変化した可能性が考えられた。そこで、AmyD の菌糸形態の制御への関与を解析するために、*amyD* 破壊株 ( $\Delta amyD$ )、*creA/amyD* 二重破壊株 ( $\Delta creA \Delta amyD$ ) 及び *amyD* 高発現株 (*amyD* o/e) を作製した。各株は実験方法 0-2-12) 及び 0-2-13)に従って作製し、ゲノム PCR 及びサザンブロット解析により目的の形質転換株が取得できたことを確認した (Fig. 2-9)。

#### 2-3-9) *amyD* 遺伝子破壊株及び高発現株の液体培養時の菌糸形態の観察

麹菌において *amyD* 破壊及び高発現が液体培養時の菌糸形態に影響を及ぼすのか解析するために、 $\Delta amyD$ 、 $\Delta creA \Delta amyD$  及び *amyD* o/e の菌糸形態を観察した結果、 $\Delta amyD$  は野生株と同様の形態を示すのに対し、*amyD* o/e は  $\Delta creA$  と同様にパルプ状に菌糸形態が変化した (Fig. 2-10)。一方、 $\Delta creA \Delta amyD$  はパルプ状の形態は示さないものの、野生株と比較して小さいペレットを形成した。

#### 2-3-10) *amyD* 破壊株及び高発現株の薬剤感受性試験

*amyD* の破壊及び高発現によって細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量に影響を及ぼすか解析するために、実験 2-3-3)と同様にして calcofluor white 及び Congo Red に対する薬剤感受性を観察した。その結果、 $\Delta amyD$  及び  $\Delta creA \Delta amyD$  は薬剤への感受性は観察されなかったものの、*amyD* o/e は calcofluor white 及び Congo Red に対して高い感受性を示し、薬剤を含まない培地と比較して生育が著しく悪化した (Fig. 2-11)。

#### 2-3-11) *amyD* 破壊株及び高発現株における細胞壁構成多糖の成分解析

実験 2-3-9) 及び 2-3-10) の結果から、AmyD は  $\Delta creA$  における菌糸形態の変化に関与していることが示唆された。そこで、*amyD* の破壊及び高発現により細胞壁構成多糖がどのように変化するのか明らかにするために、各株の細胞壁を分画して各画分の中に含まれる糖の成分解析を行なった。まず、各画分の重量を測定した結果、 $\Delta amyD$ 、 $\Delta creA \Delta amyD$  及び *amyD* o/e において AS2 及び AI 画分の重量が野生株と比較して増加または減少していた (Fig. 2-12 A)。さらに、それぞれの画分に含まれる糖の成分解析を



行なった結果、*amyD* o/e において AI 画分中のキチン由来のグルコサミン及び $\beta$ -グルカン由来のグルコースの量が野生株と比較して減少していた。一方、AS2 画分に含まれる $\alpha$ -グルカン由来のグルコース量は、 $\Delta amyD$  及び *amyD* o/e は野生株と、 $\Delta creA \Delta amyD$  は  $\Delta creA$  とほぼ同等の値を示した (Fig. 2-12 B)。

#### 2-3-12) $\alpha$ -グルカンの分子量測定

*A. niger* において AgtA (AmyD オーソログ) は $\alpha$ -1,4-glucanotransferase 活性を有することから、 $\alpha$ -グルカン中の $\alpha$ -1,4 結合の切断に関与すると考えられている。このことから、 $\Delta creA$  では AmyD の高発現によって鎖長の短い $\alpha$ -グルカンが生じている可能性が考えられた。そこで、各株の AS2 画分に含まれる $\alpha$ -グルカンの分子量をピークトップの Retention time から計算した結果、 $\Delta amyD$  及び  $\Delta creA \Delta amyD$  は野生株とほぼ同等の分子量を示すのに対し、 $\Delta creA$  及び *amyD* o/e の $\alpha$ -グルカンは野生株よりも小さな分子量を示し、さらに *amyD* o/e は  $\Delta creA$  よりも分子量が小さくなった (Fig. 2-13)。

#### 2-4) 考察

本章では、 $\Delta creA$  において液体培養時に菌糸形態が変化する要因を明らかにすることを目的として解析を行った。

糸状菌において、*creA* 変異株は野生株よりも生育が著しく悪化することがよく知られており、麴菌においても寒天培地において  $\Delta creA$  は生育が悪化することが観察された (Fig. 2-1 A)。しかし、寒天培地とは異なり液体培地では  $\Delta creA$  の生育悪化は観察されず、むしろ野生株よりも生育が良くなることが認められた。(Fig. 2-1 B)。 *A. oryzae* において $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* の破壊株は、 $\Delta creA$  と同様に液体培養時に菌糸形態が変化し、さらに液体培地において野生株よりも *agsB* 破壊株の方が生育が良くなることが報告されている (Zhang *et al.*, 2017; Miyazawa *et al.*, 2016)。このことから、 $\Delta creA$  における液体培養時の菌糸形態の変化は菌体量の増加に効果があり、液体培養条件における酵素高生産株の構築に *creA* 破壊は非常に有効な変異であることが期待された。

$\Delta creA$  における菌糸形態が変化した要因として、*agsB* 破壊株のように細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量が減少していることが予想された。しかし、予想に反して  $\Delta creA$  では細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量が増加しており、さらに *agsB* の発現量も野生株の約 10 倍増加してい

た (Fig 2-5; Fig. 2-6)。このことから、 $\Delta creA$  では *agsB* の発現量の増加に伴い細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量が増加したことが示唆され、 $\Delta creA$  は *agsB* 破壊株とは異なり $\alpha$ -グルカン量の低下により菌糸形態が変化したのではないことが考えられた。一方、 $\alpha$ -グルカン以外の細胞壁構成多糖であるキチンや $\beta$ -グルカンの量やそれらの合成酵素遺伝子の発現量は $\Delta creA$  と野生株間でほとんど差がなかったことから (Fig. 2-5; Fig. 2-7)、 $\Delta creA$  の菌糸形態の変化には $\alpha$ -グルカンが重要な働きをしていることが示唆された。

糸状菌において $\alpha$ -グルカンは菌糸間の接着因子として働き、*agsB* 破壊株では細胞壁中の $\alpha$ -グルカンの減少により菌糸間の接着性が失われることで、野生株のように液体培養時に菌糸が絡まり合うことができず、培地中に菌糸が分散すると考えられている (Fontaine *et al.*, 2010, Yoshimi *et al.*, 2013)。さらに、これまでに *agsB* を $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* プロモーターを用いて高発現させた株の菌糸形態を観察した結果、野生株と比較して菌糸が過剰に接着し合い、フラスコのガラス壁面に菌体が吸着するという異常な菌糸形態を示すことが観察されたものの、パルプ状への菌糸形態の変化は観察されなかった (張ら、2015)。このことから、 $\Delta creA$  では $\alpha$ -グルカン量は増加しているものの、合成された $\alpha$ -グルカンの菌糸接着性が失われた可能性が考えられた。

そこで、 $\Delta creA$  における $\alpha$ -グルカンの菌糸接着性の欠損には、*amyD* の発現量が野生株よりも 50 倍以上増加していたことが関与しているものと予想した (Fig. 2-8)。これまでに *A. nidulans* において *amyD* を高発現させた結果、液体培養時に野生株よりも小さなペレット状の菌糸形態を示し、細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量も低下したことから、AmyD は $\alpha$ -グルカンの分解に関与することが明らかになっている (He *et al.*, 2013)。さらに *A. niger* において AmyD オーソログである AgtA は、 $\alpha$ -1,4-glucanotransferase 活性を有すると報告されており、また *A. wentii* の細胞壁中の $\alpha$ -グルカンは、約 100 個のグルコースが $\alpha$ -1,3 結合で連結してできたグルコース鎖が $\alpha$ -1,4 結合のグルコース鎖を介して次々と連結してできた直鎖によって構成されていることが明らかになっている (Van der Kaaij *et al.*, 2007; Choma *et al.*, 2014)。以上のことから、*amyD* が高発現することで $\alpha$ -グルカン内の $\alpha$ -1,4 結合が過剰に切断され、短い鎖長の $\alpha$ -グルカンが多量に生じる可能性が考えられた。麹菌の *amyD* 高発現株は $\Delta creA$  と同様にパルプ状に菌糸形態が変化し、さらに Congo Red 及び Calcofluor white への感受性が高まったことから、*A. nidulans* の *amyD* 高発現株と同様に $\alpha$ -グルカン量が減少していることが予想された (Fig. 2-10; Fig. 2-11)。

しかし、予想に反して *amyD* 高発現株と野生株間で $\alpha$ -グルカン量に大きな差は認められなかった (Fig. 2-12)。そこで実際に $\alpha$ -グルカンの分子量を解析した結果、 $\Delta creA$  及び *amyD* 高発現株では野生株よりも $\alpha$ -グルカンの分子量が小さくなっており、特に *amyD* 高発現株は $\Delta creA$  よりも分子量が小さくなっていることが明らかになった (Fig. 2-13)。以上の結果から、 $\Delta creA$  では AmyD の高発現により鎖長の短い $\alpha$ -グルカンが合成されたことで菌糸間の接着性が失われ、菌糸が培地中に分散したことが示唆された。

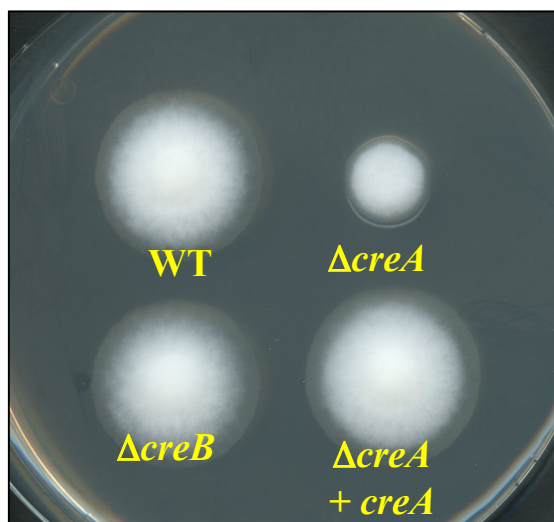
一方、 $\Delta creA \Delta amyD$  の菌糸形態は $\Delta creA$  とは異なりパルプ状にはならないものの、野生株よりも小さいペレット状の菌糸形態を示したことから、 $\Delta creA$  の菌糸形態の変化には AmyD 以外の因子も関与することが示唆された。*A. nidulans* において $\alpha$ -グルカンの分解には、AmyD に加えて $\alpha$ -glucanase である AgnB 及び MutA が関与していることが明らかになっている (He et al., 2017)。これまでに 5%マルトースを含む YP 培地で 48 時間培養した菌体を用いたマイクロアレイ解析の結果、興味深いことに $\alpha$ -グルカナーゼ遺伝子 *agnB* の発現量が野生株よりも約 10 倍増加していた (data not shown)。このことから、*agnB* の高発現は $\Delta creA \Delta amyD$  が小さなペレット状の菌糸形態を示すことに関与する可能性が考えられた。そこで今後は *creA/amyD/agnB* 三重破壊株を作製し、液体培養時の菌糸形態への影響を観察すると同時に、マイクロアレイ解析により新規菌糸形態制御因子を探索する予定である。

本研究において CreA は *amyD* の発現を制御することが明らかになった。細胞壁中の $\alpha$ -グルカンは培養前期と比較して後期で減少することが Zhang らによって明らかにされ、炭素源が枯渇する培養後期では $\alpha$ -グルカンを分解して炭素源として利用する可能性が考えられた (Zhang et al., 2017)。さらに、*A. nidulans* において *amyD* は培養後期で発現量が増加することから、炭素源が枯渇する培養後期において AmyD は $\alpha$ -グルカンの分解に関与することが予想された (He et al., 2013)。CreA は CCR 制御因子であることから、炭素源が豊富な条件では $\alpha$ -グルカンの分解に関与する遺伝子の発現を抑制し、一方炭素源が枯渇した条件ではその抑制を解除し、 $\alpha$ -グルカンの分解を促進することで炭素源を得ている可能性が考えられた。炭素源枯渇条件下では $\alpha$ -グルカン以外にも、細胞壁構成多糖であるキチンや $\beta$ -グルカンなどの分解酵素遺伝子の発現量が増加することが報告されており、*A. nidulans* において *creA* 変異株はキチン分解酵素の活性が高くなることが明らかになっている (Nitsche et al., 2012; Emri et al., 2006)。しかし、*A. nidulans*

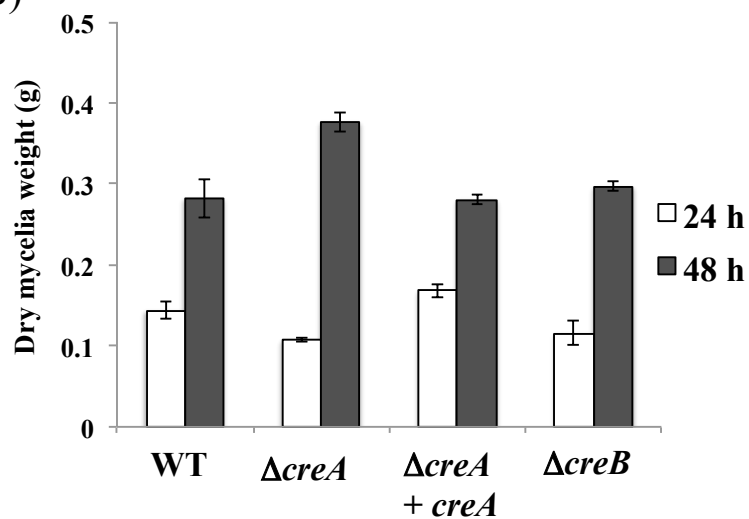
において *amyD* の発現は炭素源枯渇条件下において誘導されないことが報告されていることから、麹菌と他の糸状菌では AmyD の制御機構が異なる可能性も考えられる (Nakamura *et al.*, 2006)。そこで今後は、継時的な *amyD* の発現解析を行うことで AmyD の  $\alpha$ -グルカン分解における役割について理解を深めるとともに、*A. nidulans* や *A. luchuensis* などの他の糸状菌の *creA* 変異株も麹菌と同様に菌糸形態が変化するのか解析することで、CreA による糸状菌の細胞壁構成多糖の成分制御機構の解明が期待される。

2-5) 図表

(A)



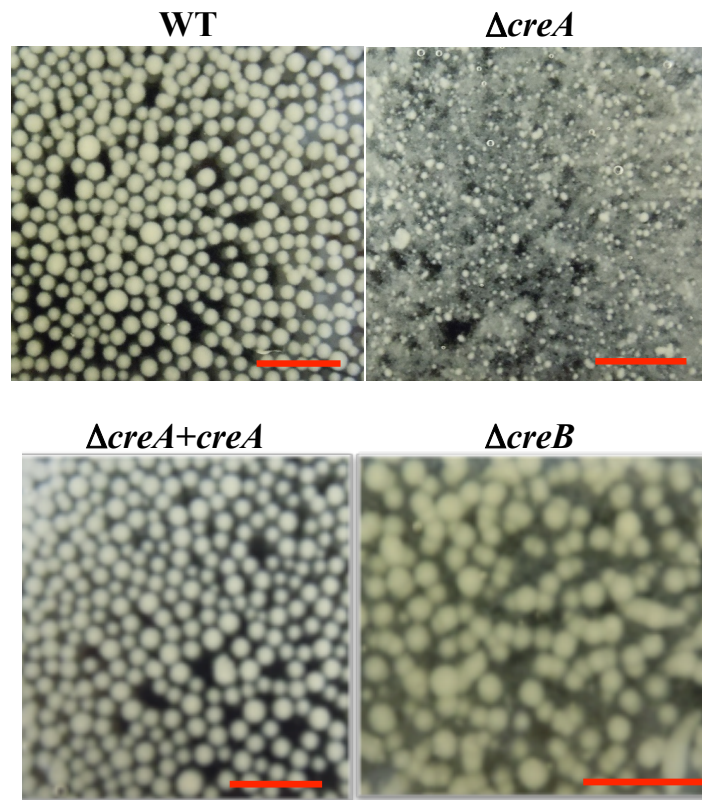
(B)



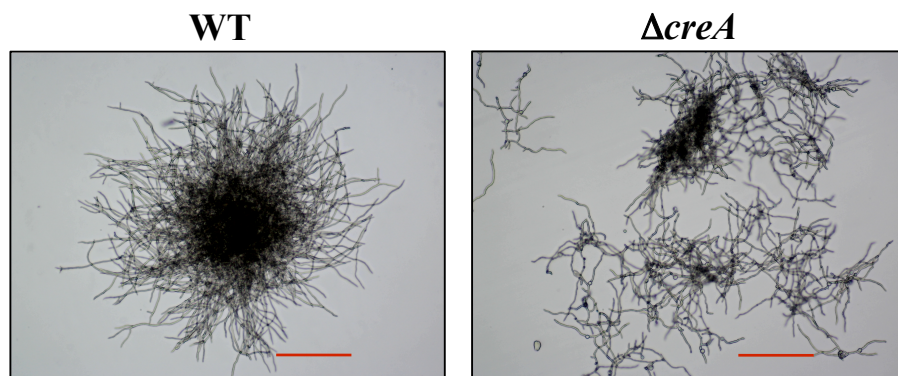
**Fig. 2-1 Growth on agar plate and in submerged culture.**

Each strain was grown on YP plus 1% maltose agar plate for 48 h (A) or in liquid YP medium containing 1% maltose and dry mycelia weight was measured (B). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars.

(A)



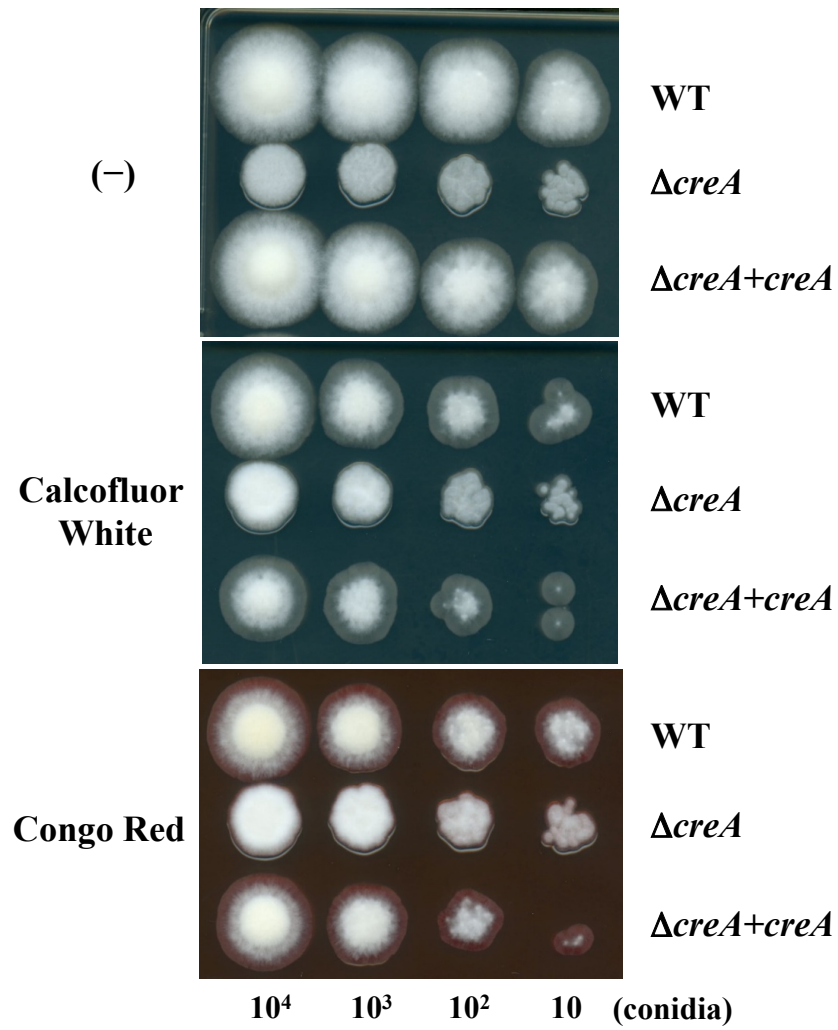
(B)



**Fig. 2-2 Hyphal morphology in submerged culture.**

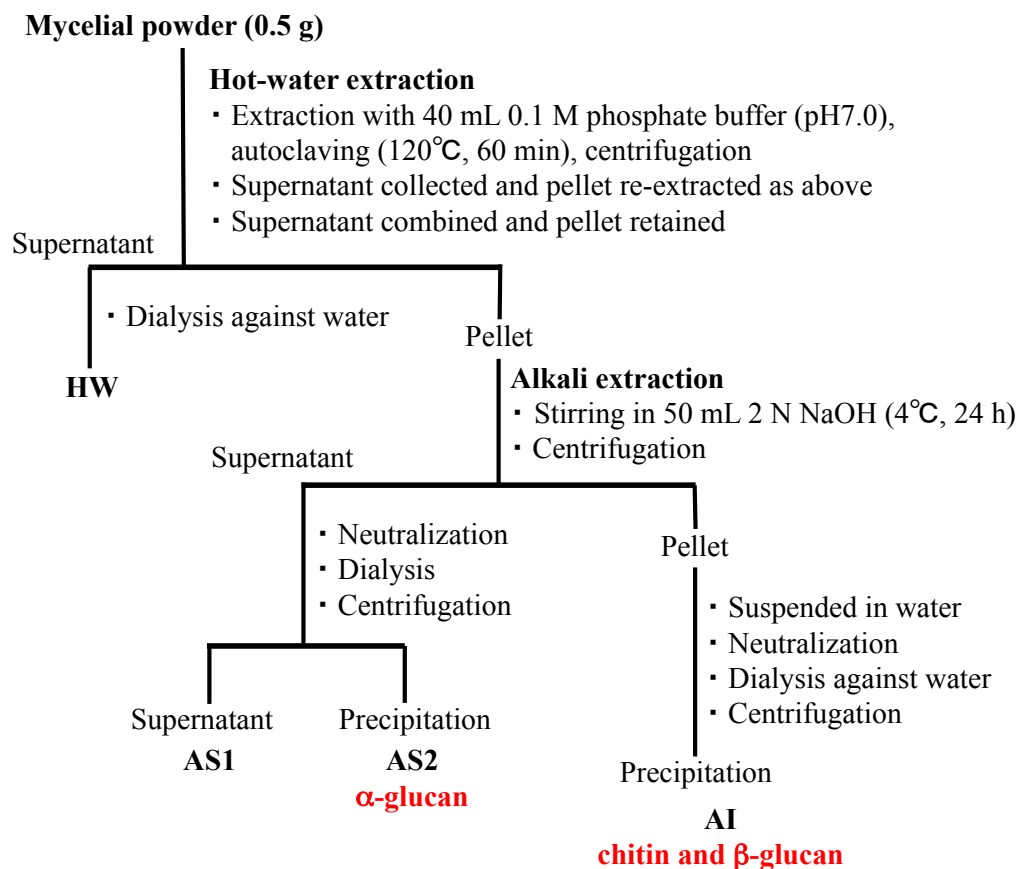
Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h (A) or 12 h (B).

Bar; 10 mm (A) or 1 mm (B)



**Fig. 2-3 Drug sensitivity test.**

Each strain was grown on YP plus 1% maltose agar medium containing 30  $\mu\text{g/ml}$  calcofluor white or 200  $\mu\text{g/ml}$  Congo red for 48 h.



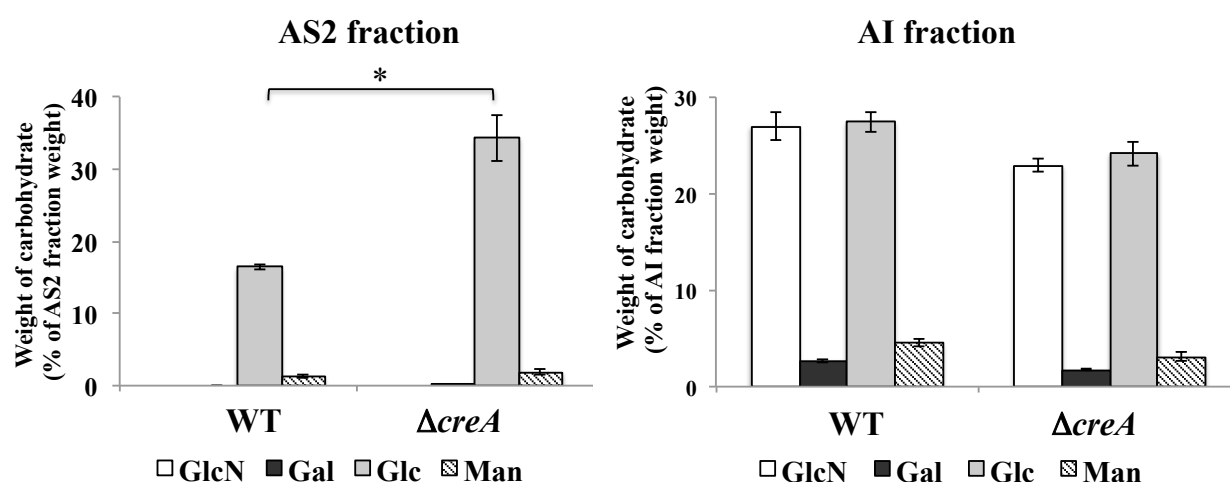
**Fig. 2-4 Fraction scheme of cell wall using hot-water and alkali treatment.**



(A)

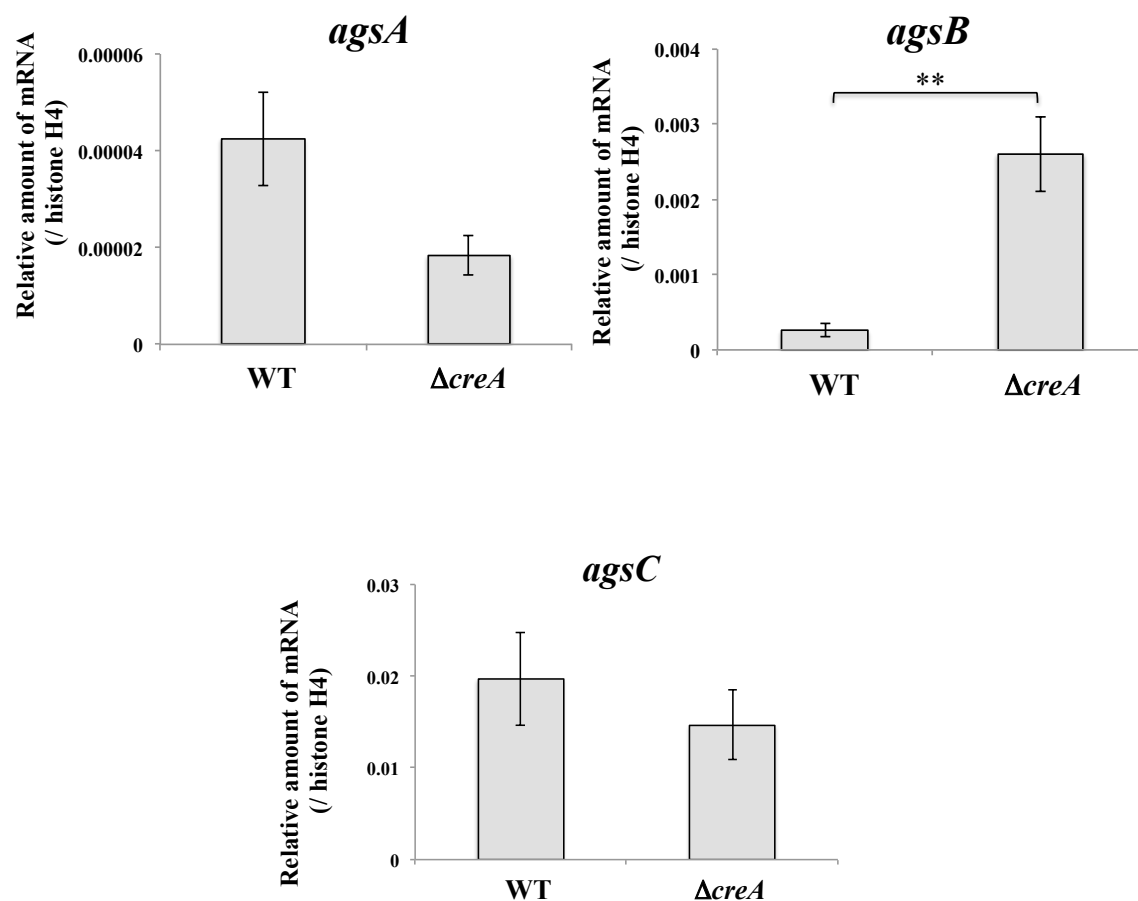
Strain	Yield (%)			
	HW	AS1	AS2	AI
WT	34.5 ( $\pm 3.5$ )	13.4 ( $\pm 3.9$ )	13.0 ( $\pm 0.5$ )	39.1 ( $\pm 0.7$ )
$\Delta creA$	33.6 ( $\pm 2.8$ )	10.4 ( $\pm 2.9$ )	9.3 ( $\pm 0.3$ )	46.8 ( $\pm 0.3$ )

(B)



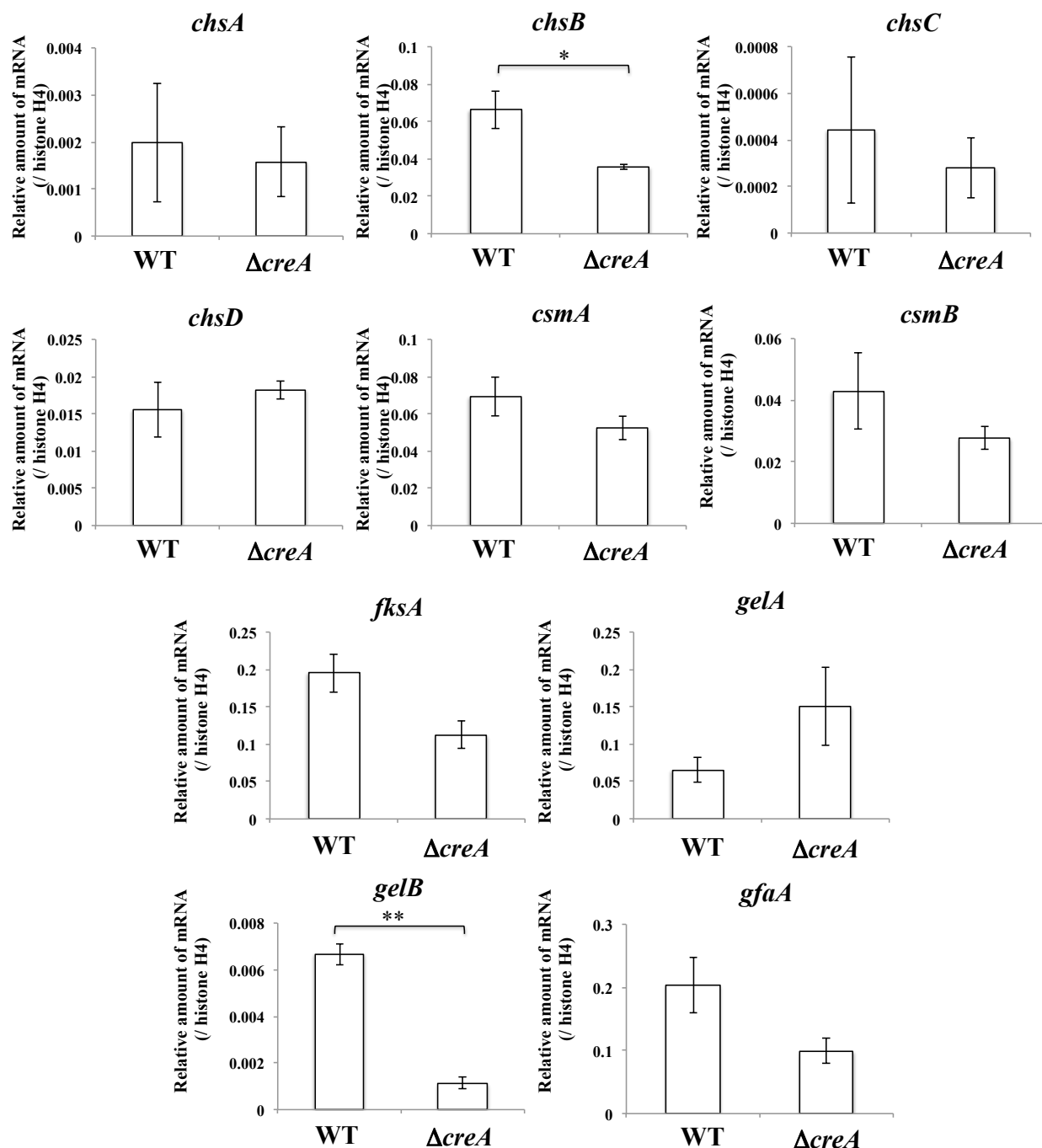
**Fig. 2-5 Comparison of cell wall components**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h and cell wall components were fractionated. The yield of each fraction was represented as the percentage of the total dry weight (A) and monosaccharide composition in each fraction was determined (B) (GlcN, glucosamine; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ ; Student's t test)



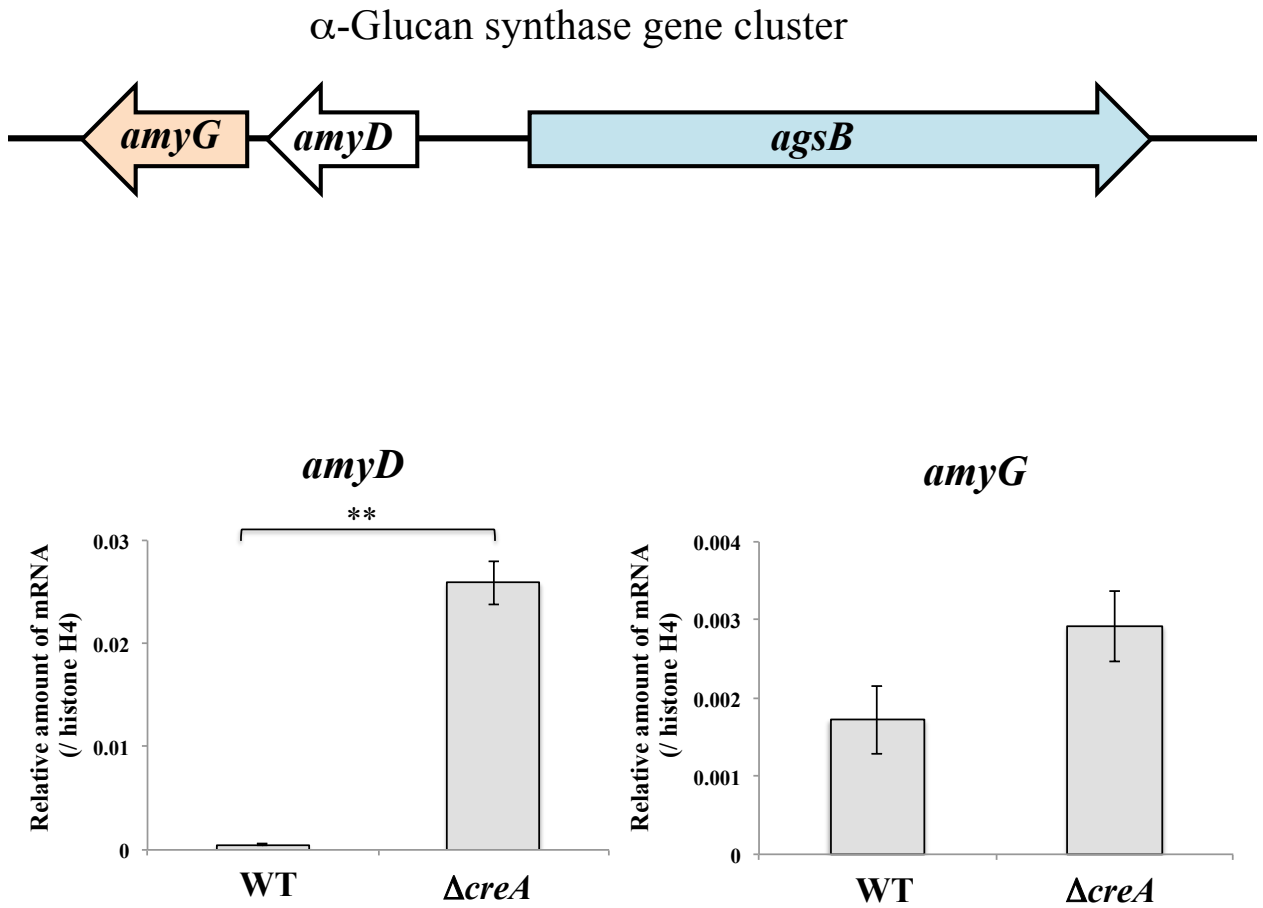
**Fig. 2-6 Expression levels of  $\alpha$ -1,3-glucan synthase genes.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h and expression levels of  $\alpha$ -1,3-glucan synthase genes (*agsA*, *agsB* and *agsC*) were determined by quantitative RT-PCR. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\*\* $p < 0.01$ ; Student's t test)



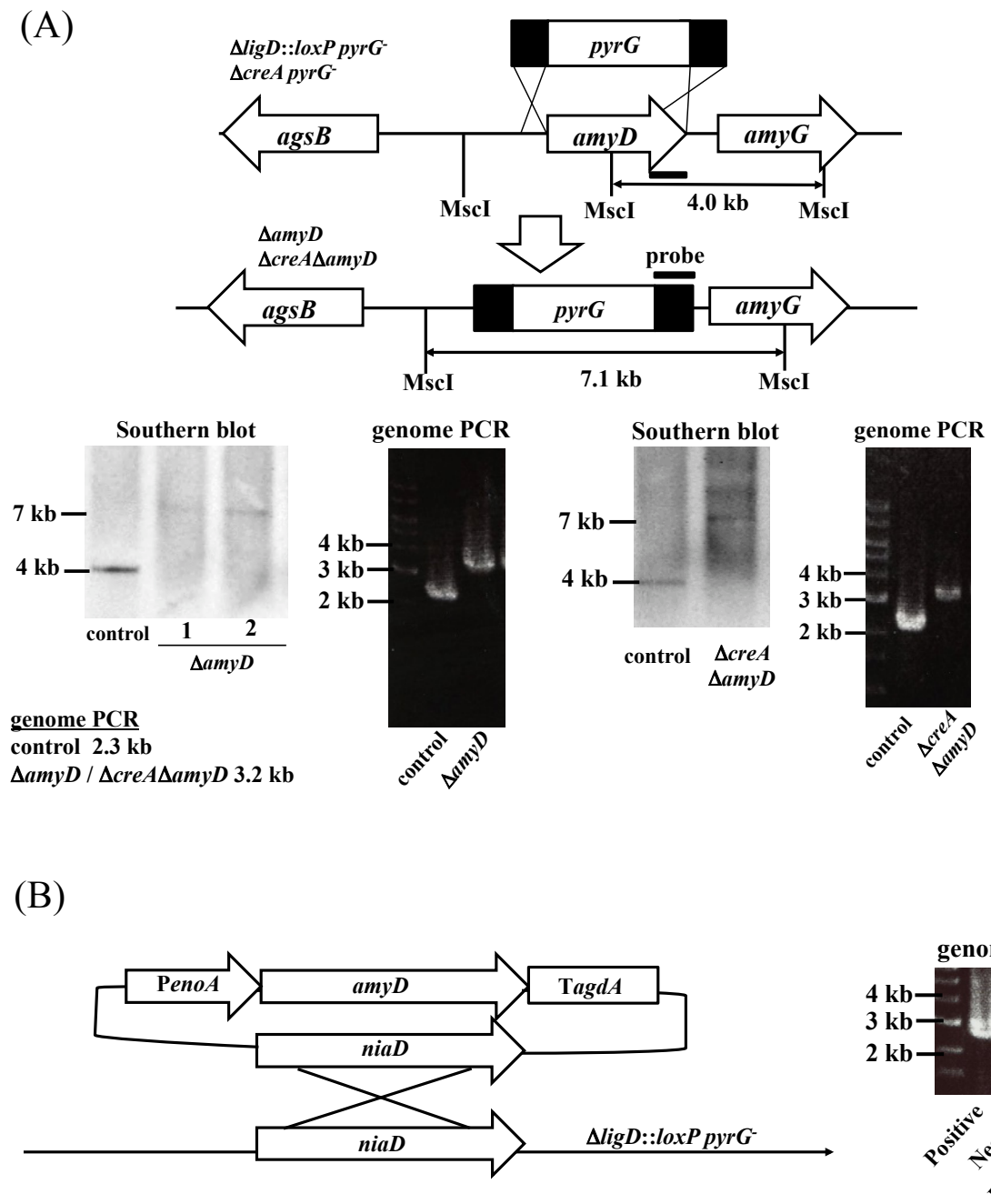
**Fig. 2-7 Expression levels of cell wall-related genes.**

Each strains was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h and expression levels of cell wall-related genes were determined by quantitative RT-PCR. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's t test)



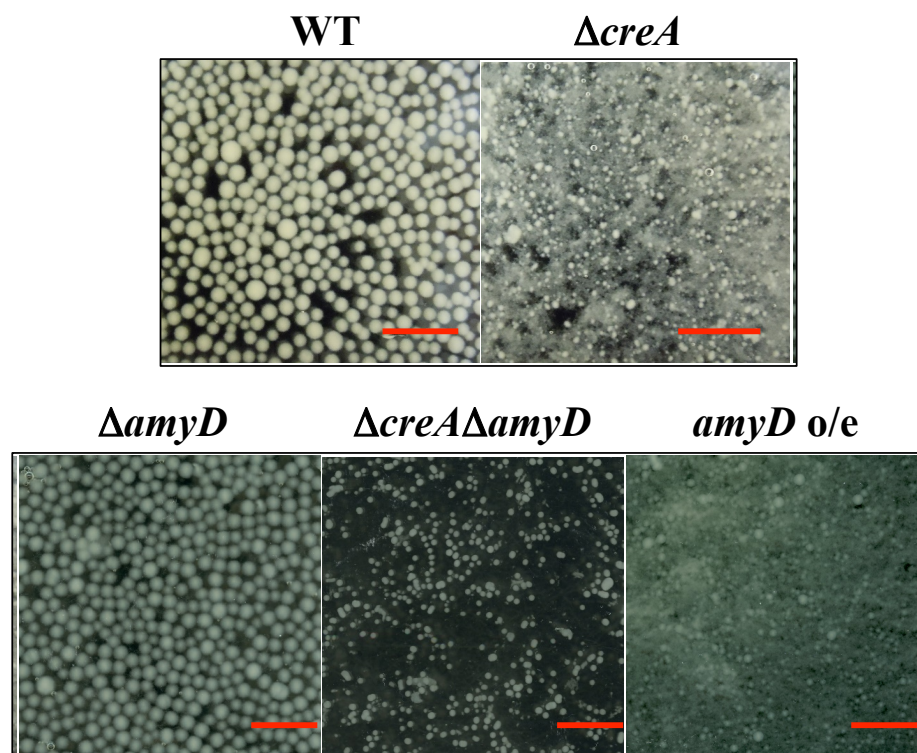
**Fig. 2-8 Expression levels of  $\alpha$ -glucan synthase gene cluster.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h and expression levels of  $\alpha$ -glucan synthase gene cluster (*amyD* and *amyG*) were determined by quantitative RT-PCR. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\*\* $p < 0.01$ ; Student's t test)



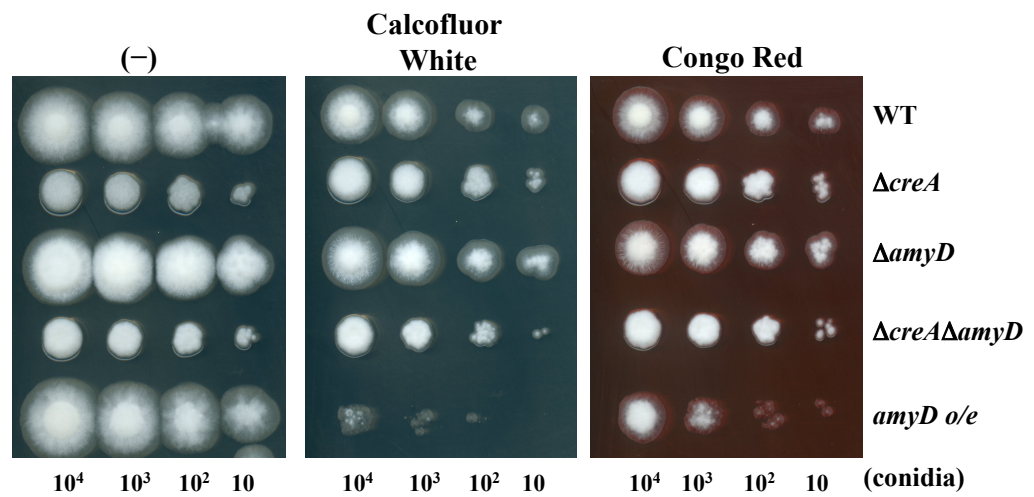
**Fig. 2-9 Construction of *amyD* deletion and *amyD* overexpression strains.**

Scheme and confirmation of *amyD* gene deletion strain (A) and *amyD* overexpression strain (B).



**Fig. 2-10 Hyphal morphology of *amyD* deletion and *amyD* overexpression strains in submerged culture.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h. Bar; 10 mm



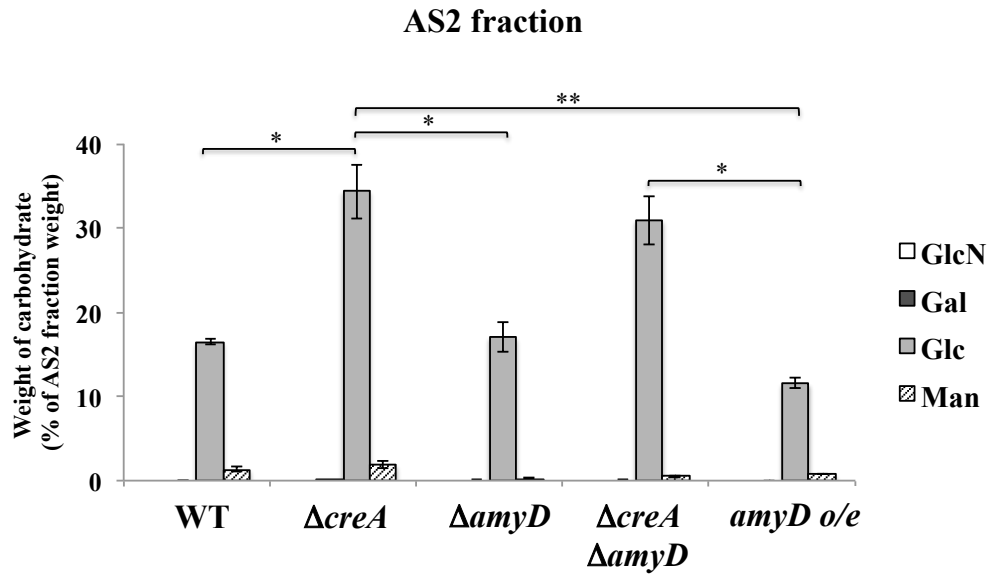
**Fig. 2-11 Drug sensitivity test of *amyD* deletion and *amyD* overexpression strains.**

Each strain was grown on YP plus 1% maltose agar medium containing 30  $\mu\text{g/ml}$  calcofluor white or 200  $\mu\text{g/ml}$  Congo red for 48 h.

(A)

Strain	Yield (%)			
	HW	AS1	AS2	AI
WT	34.5 ( $\pm 3.5$ )	13.4 ( $\pm 3.9$ )	13.0 ( $\pm 0.5$ )	39.1 ( $\pm 0.7$ )
$\Delta creA$	33.6 ( $\pm 2.8$ )	10.4 ( $\pm 2.9$ )	9.3 ( $\pm 0.3$ )	46.8 ( $\pm 0.3$ )
$\Delta amyD$	33.4 ( $\pm 0.90$ )	6.6 ( $\pm 0.2$ )	24.9 ( $\pm 0.5$ )	35.1 ( $\pm 1.3$ )
$\Delta creA \Delta amyD$	24.5 ( $\pm 0.7$ )	7.7 ( $\pm 0.4$ )	17.0 ( $\pm 0.6$ )	50.9 ( $\pm 0.5$ )
<i>amyD</i> o/e	31.1 ( $\pm 0.6$ )	11.3 ( $\pm 0.2$ )	16.2 ( $\pm 0.6$ )	41.4 ( $\pm 1.0$ )

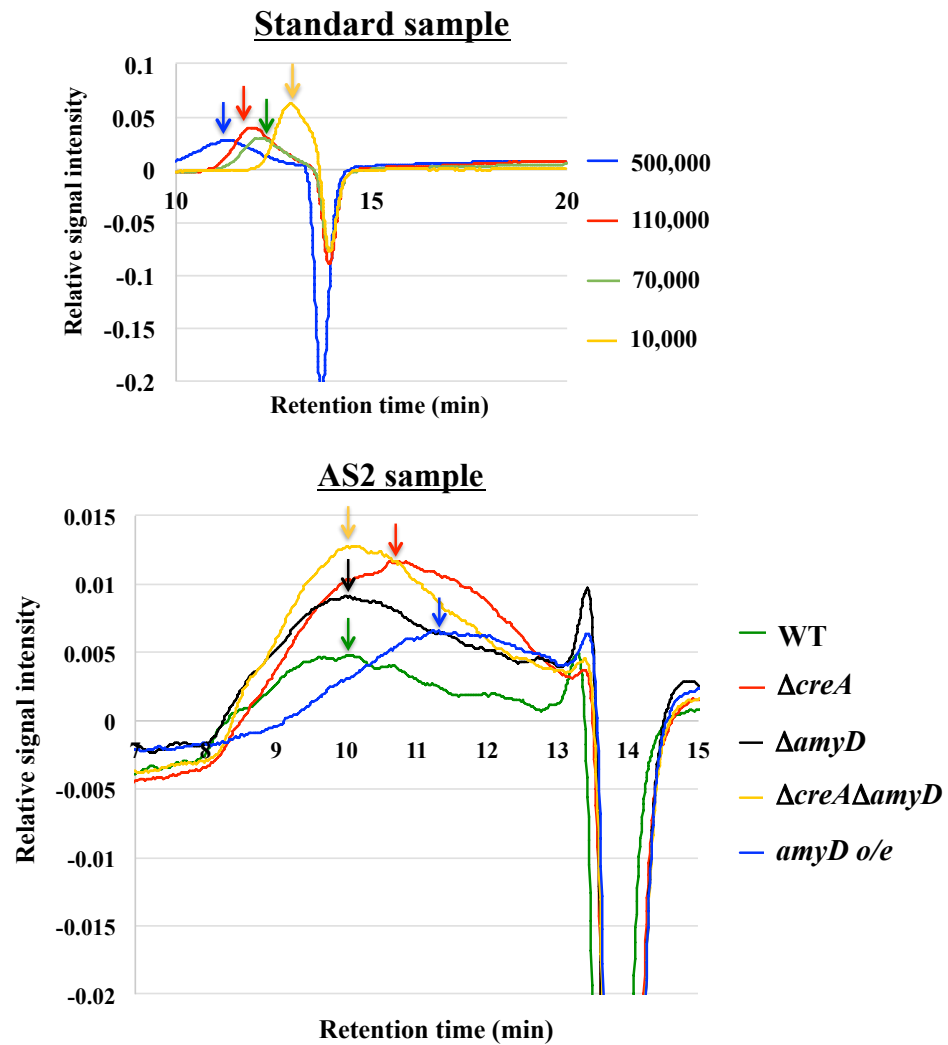
(B)



**Fig. 2-12 Comparison of cell wall components of *amyD* deletion and *amyD* overexpression strains.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h and cell wall components were fractionated. The yield of each fraction was represented as the percentage of the total dry weight (A) and monosaccharide composition in AS2 fraction was determined (B) (GlcN, glucosamine; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Tukey-Kramer method)





strain	Peaktop Retention time
WT	10.058
$\Delta creA$	10.825
$\Delta amyD$	10.050
$\Delta creA \Delta amyD$	10.092
<i>amyD</i> o/e	11.242

**Fig. 2-13 Molecular weight of  $\alpha$ -glucan.**

Each strain was grown in liquid YP medium containing 1% maltose for 24 h and cell wall components were fractionated. Molecular weight of  $\alpha$ -glucan in AS2 fraction was determined.

## 第 3 章

### カーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による有機酸生制御への関与

#### 3-1) 緒言

麹菌は炭素源や窒素源の種類、pH や温度などの外的環境の変化によって遺伝子発現を変動させる。そのため、培養条件によって麹菌が生産するタンパク質の種類や量は大きく変化し、わずかな培地の組成の変化によっても酵素の生産性に大きな影響を及ぼす。第 1 章において、YP 培地を用いて  $\Delta creA$  及び  $\Delta creB$  の  $\alpha$ -アミラーゼ生産性を解析した結果、野生株よりも高い  $\alpha$ -アミラーゼ生産性を示すことを明らかにした。そこで、完全培地以外の培地を用いても同様に  $\alpha$ -アミラーゼを高生産するか検証するために、0.1% ポリペプトンを窒素源とした最小培地を用いて解析したところ、 $\Delta creB$  は YP 培地と同様に野生株よりも生産性が向上したものの、興味深いことに  $\Delta creA$  は野生株と比較して顕著に生産性が低下した。

CreA は  $C_2H_2$  型の広域制御型転写因子であり、第 1 章で述べた  $\alpha$ -アミラーゼやキシラーゼなどの酵素遺伝子に加えて、第 2 章の細胞壁構成多糖の合成及び分解に関与する遺伝子など、多様な遺伝子の発現制御に関与している。さらに、第 1 章で観察されたように炭素源の種類や濃度、液体培地と固体培養などの培地条件の違いによって、CreA の制御下の遺伝子の発現量は大きく変化する。今回  $\Delta creA$  の  $\alpha$ -アミラーゼ生産性の低下が観察された最小培地は、YP 培地と同様にマルトースを炭素源としているものの、その他の培地成分は完全培地とは異なっていることから、完全培地と比較して多くの遺伝子の発現パターンが大きく変化していることが予想された。

$\Delta creA$  の産業利用を目指す上で培地によって酵素生産性が低下することは大きな問題であり、最小培地において  $\Delta creA$  の  $\alpha$ -アミラーゼ生産性が低下した原因を明らかにすることで、培地条件に依存せず安定的に酵素を高生産することが可能な麹菌株を造成するための有益な知見を得ることができると考えられた。そこで本章では、 $\Delta creA$  において  $\alpha$ -アミラーゼ生産性が低下した要因を解明することを目的とした。

#### 3-2) 実験方法

##### 3-2-1) 菌株

本章で使用した菌株を以下に記した。 $\Delta ligD$  及び  $\Delta creB$  はプラスミド (pUC-*niaD-sC*) を用いて *niaD* 及び *sC* マーカー遺伝子に戻した株 ( $\Delta ligD+sC+niaD$ ,  $\Delta creB+sC+niaD$ ) を用い、 $\Delta ligD+sC+niaD$  株を野生株とした。

Table 3-1 Strains

strain	Genotype	Reference
$\Delta ligD+sC+niaD$	$\Delta ligD::loxP$ ; $sC^+$ ; $pyrG^+$ ; $niaD^+$	This study
$\Delta creA$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta creA::sC$ ; $pyrG^+$ ; $niaD^+$	Ichinose <i>et al.</i> (2014)
$\Delta creB+sC+niaD$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta creB::pyrG$ ; $sC^+$ ; $niaD^+$	This study
$\Delta acuF$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta acuF::pyrG$ ; $sC^-$ ; $niaD^-$	This study
$\Delta creA\Delta acuF$	$\Delta ligD::loxP$ ; $\Delta creA::pyrG$ ; $\Delta acuF::pyrG$ ; $niaD^-$	This study

### 3-2-2) PCR プライマー

本章で使用した PCR プライマーを以下に記した。

Table 3-2 Nucleotide sequences of primers

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
amyB qRT-PCR sen	TACTATCCACTCCTCAACGC
amyB qRT-PCR anti	TGAATGCTGCGACGTTCTTG
histoneH4 qRT-PCR sen	CAAGCGTATCTCTGCCATGA
histoneH4 qRT-PCR anti	CACCGAAACCGTAGAGGGTA
acuF up sen	TGGTCTGTGACGGTTAGC
acuF up anti AnpyrG	GAGCCCAAGGCGCTGCAGCAGGAAGTCCAGAAGGCGTTTC
acuF down sen AnpyrG	GCGGGGATGGAGATCTCGACCTCTATATTGCATGGCGTG
acuF down anti	TGTCTCCAGTTAGCCAATG
AnpyrGsen	GGTCGAGATCTCCATCCCCGCAAACACTAC
AnpyrGantiPstI	CCTGCTGCAGCGCCTTGGGCTCATATAAC

### 3-2-3) 培地

・ Czapek-Dox 培地 (最小培地) ; 0.1% polypeptone, 1% maltose, 7 mM KCl, 11 mM  $KH_2PO_4$ , 2 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1×Trace elements

目的に応じて 0.1% polypeptone を他の窒素源に変更した。

### 3-2-4) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は Tamano らの方法に従った (Tamano *et al.* 2008)。

#### (1) mRNA の精製

mRNA の精製には、Oligotex<sup>TM</sup>-dT30<Super>mRNA Purification Kit (TaKaRa) を用い

た。実験方法 (0-2-14) に従って抽出した total RNA を用いて、1.5 ml 遠心チューブに以下の反応液を調整した。

Total RNA (0.5-1 mg) X  $\mu$ l

2×Binding Buffer 150  $\mu$ l

Oligotex<sup>TM</sup>-dT30<Super> 15  $\mu$ l

RNase free water (150-X)  $\mu$ l

---

Total 315  $\mu$ l

調整した反応液を穏やかに攪拌し、70℃で3分間加熱することで RNA を変性させた後、室温で10分間静置することで Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 と mRNA をハイブリダイゼーションさせた。4℃、15,000 rpm で5分間遠心して上清を除去した後、Wash Buffer 350  $\mu$ l で沈殿として得られた Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 を懸濁した後、キットに付属していたスピncラムセットに懸濁液を移し、4℃、15,000 rpm で30秒間遠心した。カップから Wash Buffer を除去し、再び Wash Buffer 350  $\mu$ l を加えて沈殿を懸濁し、4℃、15,000 rpm で30秒間遠心した。カラムを新しいスピncラム用遠心チューブに移し、予め70℃に加熱しておいた RNase free water 50  $\mu$ l で Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 をよく懸濁し、すぐに室温で15,000 rpm、30秒間遠心して mRNA を溶出させた。再び70℃に予熱しておいた RNase free water 50  $\mu$ l を加えて Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 を懸濁した後、同様にして遠心し、得られた mRNA 溶液の濃度を Nano drop を用いて測定した。mRNA の濃度が 100 ng/ $\mu$ l の場合は、エタノール沈殿処理により濃縮した。

## (2)ポストラベリング法

ポストラベリング法には、CyScribe<sup>TM</sup> Post-Labeling Kit (GE Healthcare) を用いた。

### i) アミノアシル標識 cDNA の合成

(1)で精製した mRNA を用いて以下の反応液を調整した。

精製済み mRNA (1  $\mu$ g) X  $\mu$ l

Random nanomer primers 1  $\mu$ l

Anchored oligo(dT) primer 1  $\mu$ l

RNase free water (9-X)  $\mu$ l

---

Total 11  $\mu$ l

調整した反応液を穏やかに混合し、70℃で5分間反応させた。室温に10分間静置し

た後、事前に混合しておいた以下の反応溶液を加え、42℃で 90 分間反応させた。

5×CyScribe Buffer 4 µl

0.1 M DTT 2 µl

CyScribe nucleotide Mix 1 µl

CyScribe Amino Allyl dUTP 1 µl

CyScribe reverse transcriptase 1 µl

---

Total 9 µl

反応終了後、mRNA を分解させるために 2.5 M NaOH 2 µl を加えて 37℃で 15 分間反応させた。そこに 2 M HEPES 10 µl を加え、ボルテックスでよく混和後氷上に静置した。

#### ii) CyScribe GFX Purification kit による cDNA の精製

CyScribe™ GFX™ Purification kit (GE Healthcare) を用いて cDNA の精製を行なった。キットに付属しているコレクションチューブと GFX スピнкаラムをセットし、Capture Buffer 500 µl を添加したところに、(i) で合成した cDNA を全量加えてピペッティングによりよく混和した。室温、13,800 rpm で 30 秒間遠心し、コレクションチューブに溜まった Capture Buffer を除いた。カラムに 80%エタノール 600 µl を加え、室温、13,800 rpm で 30 秒間遠心し、コレクションチューブに溜まった 80%エタノールを除く操作を計 3 回行うことで cDNA の洗浄し、最後に完全に 80%エタノールを取り除くために室温、13,800 rpm で 10 秒間遠心した。新しい 1.5 ml 遠心チューブにカラムをセットし、0.1 M Sodium bicarbonate 60 µl を加えて室温で 5 分間静置した。室温、13,800 rpm で 1 分間遠心することで、精製した cDNA 溶液を回収した。

#### iii) CyDye によるアミノアシル修飾した cDNA の標識

(ii) で精製した cDNA を CyDye NHS Ester の入った 1.5 ml チューブに直接加え、完全に溶解するまでピペッティングによりよく混合した後、遮光して室温で 90 分間静置した。4 M Hydroxylamine 15 µl を加えて混合後、再び遮光して室温で 15 分間静置した。

#### iv) CyScribe GFX Purification kit を用いた cDNA の精製

(ii) と同様に CyScribe GFX Purification kit (GE Healthcare) を用いて、(iii) で標識した cDNA の精製を行なった。コレクションチューブとスピнкаラムをセットし、Capture Buffer 500 µl に (iii) で標識した cDNA を全量加え、ピペッティングによりよく混合した。室温、13,800 rpm で 30 秒間遠心し、コレクションチューブに溜まった

Capture Buffer を除いた。カラムに Wash Buffer 600  $\mu$ l 加え、室温、13,800 rpm で 30 秒間遠心してコレクションチューブに溜まった Wash Buffer を除く操作を計 3 回行うことで cDNA を洗浄し、最後に完全に Wash Buffer を取り除くために室温、13,800 rpm で 10 秒間遠心した。新しい 1.5 ml 遠心チューブにカラムをセットし、カラムに Elution Buffer 60  $\mu$ l 加えて室温で 5 分間静置した。室温、13,800 rpm で 1 分間遠心することで、精製した cDNA 溶液を得た後、遠心エバポレーター (Thermo/SAVANT DNA110 SpeedVac Concentrator) により完全に水分を除去した。

### (3) マイクロアレイ Tip の Activation

マイクロアレイの Tip には、麴菌アレイ Tip (RD-NDJ-NVS12101012) を用いた。Activation 処理を行っていない Tip を用いる場合は、Tip の activation 操作を行なった。50 ml 遠心チューブに Activation Buffer 40 ml (2 $\times$ SSC, 0.2% SDS) を作製し、Tip を浸漬して室温で 15 分間静置した。Tip を加熱済みの Activation Buffer に移して 5 分間煮沸した。Tip を Milli-Q 水で洗浄し、空の 50 ml 遠心チューブに Tip を入れて、室温、800 g で 3 分間遠心することで Tip に付着した水分を除いた。遮光をした状態で保存した。

### (4) ハイブリダイゼーション

(2) で調整した標識済み cDNA と (3) で Activation 処理を行なった Tip をハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション溶液として、以下の反応溶液を調整した。

Milli-Q 水 26.4  $\mu$ l

20 $\times$ SSC 10.2  $\mu$ l

Formamide 21  $\mu$ l

Salmon Testes DNA 0.6  $\mu$ l

10% SDS 1.8  $\mu$ l

---

Total 60  $\mu$ l

(2) において Cy5 で標識した cDNA にハイブリダイゼーション溶液 55  $\mu$ l を加えて cDNA を完全に溶解させた後、この cDNA 溶液を Cy3 で標識した cDNA が入っている 1.5 ml 遠心チューブに加えて cDNA を完全に溶解させた。95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱させることで cDNA を熱変性させた後、遮光をして室温で 30 分間静置した。(3) で準備した Tip をテンプレートの上に置き、ギャップカバーガラスを Tip の上にかぶせた後、cDNA 溶

液を Tip とギャップカバーガラスの間に流し込んだ。Tip をハイブリチャンバーにセットし、42℃で 16 時間以上ハイブリダイゼーションさせた。

#### (4) ポストハイブリダイゼーション

以下の Wash Buffer を 50 ml 遠心チューブに 40 ml ずつ調整した。

Wash Buffer 1 : 2×SSC、0.03% SDS (2 セット)

Wash Buffer 2 : 0.2×SSC

Wash Buffer 3 : 0.05×SSC

カバーガラスがついた状態の Tip を Wash Buffer 1 に入れることで、カバーガラスを外した。新しい Wash Buffer 1 にカバーガラスが外れた Tip を移し入れ、室温で 15 分間穏やかに振とうさせた。Tip を Wash Buffer 2 に移し入れ、室温で 5 分間穏やかに振とうさせた後、Wash Buffer 3 の中で Tip を室温で 5 分間穏やかに振とうさせた。Milli-Q 水で Tip を洗浄した後、空の 50 ml 遠心チューブに Tip を移し入れ、室温、800 g で 2 分間遠心することで Tip に付着した水分を取り除いた。

#### (5) Microarray Tip の画像解析

Tip の画像解析には、解析ソフト Gene Pix 4.1 及びスキャナ GenePix4000B を用いた。スキャナを用いて画像を取り込み、波長のレベルを適宜変更することで明るさを調整した。本スキャンをして得られた画像の画像処理を行うために、鋳型として 12k array sheet を用いて鋳型とスポットを合わせ、各スポットの蛍光強度をソフトによって数値化した。

#### (6) 数値データ解析

数値データの解析には、12K 麹菌アレイ解析用エクセルセット及び解析ソフト Genomic profiler を用いた。添付されたプロトコルに従って解析処理を行い、Excel ファイルで計算して得られた  $p$  値が 5%以下となったデータのみ使用した。

### 3-3) 実験結果

#### 3-3-1) 0.1% ポリペプトンを窒素源とした最小培地におけるα-アミラーゼ生産性

これまでにマルトースを含む YP 培地において、*creA* 及び *creB* 遺伝子破壊株は野生株と比較して顕著に高いα-アミラーゼ生産性を示すことを明らかにした。そこで、異な

る培地条件においても同様に $\alpha$ -アミラーゼを高生産できるか検証するために、0.1%ポリペプトンを窒素源とした最小培地における $\Delta creA$  及び $\Delta creB$  の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した結果、 $\Delta creB$  は野生株と比較して高い $\alpha$ -アミラーゼ活性を示したものの、 $\Delta creA$  は活性が著しく低下していた。さらに、培養上清を SDS-PAGE 解析に供した結果、 $\Delta creA$  では $\alpha$ -アミラーゼのバンドがほとんど観察できなかった (Fig. 3-1)。

### 3-3-2) 生育比較及び $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* の発現解析

生育の悪化や酵素遺伝子の発現量の低下は、酵素生産性の低下の要因となる。これまでに $\Delta creA$  は YP 培地では生育への影響は観察されず、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* の発現量も野生株よりも高い値を示すことを明らかにした。しかし、最小培地における $\Delta creA$  の生育及び *amyB* の発現量への影響は不明である。そこで、 $\Delta creA$  において $\alpha$ -アミラーゼ生産性が低下した原因は生育の悪化または *amyB* の発現量の低下によるものか解析するために、培養して得られた菌体の乾燥菌体重量の測定及び *amyB* の発現量を定量 PCR により解析した。その結果、 $\Delta creA$  は野生株及び $\Delta creB$  と同等の菌体量を示し、 $\Delta creA$  の *amyB* の発現量は野生株及び $\Delta creB$  よりも高い値を示した (Fig.3-2)。

### 3-3-3) 培養上清の pH の測定

麹菌の $\alpha$ -アミラーゼは pH 4 以下で活性が急激に低下することから、 $\Delta creA$  は培地中の pH が低下したことで $\alpha$ -アミラーゼ活性が低下したことが考えられた (Kundu and Das, 1970)。そこで、培養上清を経時的に回収し、培養上清の pH を測定すると同時に SDS-PAGE により $\alpha$ -アミラーゼ生産性を解析した。培養開始時から継時的に pH を測定した結果、野生株及び $\Delta creB$  は 24 時間の時点で pH 5 前後を示すのに対し、 $\Delta creA$  は 16 時間から 20 時間にかけて pH が急激に低下し、24 時間の時点では pH 4 以下を示した (Fig. 3-3 A)。さらに培養上清を SDS-PAGE 解析に供した結果、野生株及び $\Delta creB$  では時間経過ごとに $\alpha$ -アミラーゼのバンドが濃くなっていくのに対し、 $\Delta creA$  では 20 時間の時点では観察された $\alpha$ -アミラーゼのバンドが 24 時間の時点では消失していた (Fig. 3-3 B)。

### 3-3-4) 培養上清中の有機酸の定量

*Aspergillus niger* は有機酸の一種であるクエン酸を多量に分泌生産することで、培養



上清の pH を低下させることから、 $\Delta creA$  も培養上清中の有機酸の量が増加したことで pH が低下した可能性が考えられた (Karaffa *et al.*, 2001)。そこで、培養上清中のリン酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸、ピログルタミン酸、フマル酸、リンゴ酸、酢酸及び乳酸の量を HPLC により解析した結果、麹菌が主に生産する有機酸であるリンゴ酸の量は野生株と  $\Delta creA$  間で差が認められないものの、 $\Delta creA$  ではフマル酸及びピルビン酸の量が野生株よりも増加しており、特にピルビン酸の量は野生株の約 3 倍であった (Fig. 3-4)。また、クエン酸はほとんど検出されず、コハク酸はわずかに生産されていたものの野生株と比較して全ての破壊株で有意な差は認められなかった。

### 3-3-5) マイクロアレイ解析による網羅的な転写解析

実験 3-3-4) の結果から、 $\Delta creA$  ではピルビン酸の生産量の増加により培養上清の pH が低下したことが示唆された。そこで、 $\Delta creA$  においてピルビン酸の生産性が野生株よりも向上した要因を特定するために、マイクロアレイ解析により網羅的な転写解析を行った。その結果、野生株と比較して  $\Delta creA$  では多くの遺伝子の発現が上昇または低下しており、有機酸生合成遺伝子である Fumarate reductase (AO090005000592) やアミノ酸代謝分解に関与する Glutathione S-transferase (AO90003000212)、糖新生に関与する Phosphoenolpyruvate carboxykinase (*acuF*/AO90003000174) などの遺伝子の発現が野生株よりも上昇していた (Table 3-3)。一方、解糖系酵素である Enolase (*enoA*/AO90003000055) や Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase (*pfkB*/AO90010000444) の遺伝子の発現量は低下していた。

### 3-3-6) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (AcuF) の遺伝子破壊株の作製及び培養上清の pH の測定

実験 3-3-5) のマイクロアレイ解析の結果から、 $\Delta creA$  において Phosphoenolpyruvate carboxykinase (AcuF) の発現量が野生株よりも約 15 倍増加したことでピルビン酸の生産量が増加したと予想した。そこで、実験方法 (0-2-12) に従って *acuF* 破壊株 ( $\Delta acuF$ ) 及び *creA/acuF* 二重破壊株 ( $\Delta creA\Delta acuF$ ) を作製し、サザンブロット法によって目的とした株を取得できたことを確認した (Fig. 3-6 A)。得られた株を最小培地において 24 時間培養した時点での培養上清の pH を測定した結果、野生株及び  $\Delta acuF$  は pH 5 前後を

示すのに対して、 $\Delta creA \Delta acuF$  は  $\Delta creA$  と同様に pH 4 以下になった (Fig. 3-6 B)。

### 3-3-7) 窒素源の違いによる pH の変化

$\Delta creA$  を YP 培地で培養すると最小培地とは異なり培養上清は pH 6 前後を示したことから、 $\Delta creA$  は最小培地において特異的に pH が低下したことが示唆された。YP 培地と最小培地を比較すると窒素源に大きな違いがあることから、 $\Delta creA$  の培養上清の pH は窒素源によって変化すると予想した。そこで、最小培地 (0.1% ポリペプトン、70 mM 硝酸ナトリウム、1% フルクトース) で 24 時間培養し、得られた菌体を 1% マルトース及び各窒素源 (70 mM 硝酸ナトリウム、0.1% カザミノ酸) を加えた培地に移し、培養上清の pH を経時的に測定することで窒素源の違いによる pH の変化を解析した。その結果、0.1% カザミノ酸培地では 0.1% ポリペプトン培地と同様に  $\Delta creA$  は野生株と比較して急激な pH の低下が観察された。一方、硝酸ナトリウム培地では  $\Delta creA$  における pH の低下は認められなかった (Fig. 3-7 B, C)。

さらにこれまでに麹菌において窒素源飢餓条件においてリンゴ酸の生産性が向上することが報告されていることから、 $\Delta creA$  における有機酸生産量の増加も窒素源飢餓によるものの可能性が考えられた (Knuf *et al.*, 2013)。そこで、1% ポリペプトン培地を用いて同様に pH を測定した結果、0.1% ポリペプトンと同様に pH が低下したことから、pH の低下の原因は窒素源飢餓ではないことが示唆された (Fig. 3-7 D)。

### 3-3-8) アミノ酸の違いによる pH の変化

実験 3-3-7) の結果から、 $\Delta creA$  はポリペプトンやカザミノ酸というアミノ酸を含む培地において pH が低下したことから、 $\Delta creA$  における pH の低下には培地中のアミノ酸が関与していることが示唆された。そこで、どのアミノ酸が  $\Delta creA$  の pH の低下に関与しているのか解析するために、前培養して得られた菌体を単一窒素源として各種アミノ酸を 1 mM 含む培地において誘導をかけ、12 時間後の培養上清の pH を測定した。その結果、 $\Delta creA$  はロイシンやフェニルアラニンなどの特定のアミノ酸を含む培地において野生株よりも pH が低下することが観察された (Table. 3-4)。

### 3-4) 考察

本章では、0.1% ポリペプトンを窒素源とした最小培地において $\Delta creA$  の $\alpha$ -アミラーゼ生産性が低下した要因を解明することを目的とした。

$\Delta creA$  を最小培地で培養した結果 YP 培地と同様に生育への影響は観察されず、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* の発現量も野生株より高い値を示した (Fig. 3-1; 3-2)。一方、経時的に $\alpha$ -アミラーゼ生産量及び培養上清の pH を解析した結果、興味深いことに $\Delta creA$  は時間経過ごとに pH が低下していき、 $\alpha$ -アミラーゼ生産量も pH の低下に伴って減少することが観察され、さらに pH 4 以下を示した 24 時間の時点では培地中の $\alpha$ -アミラーゼが完全に消失していた (Fig. 3-3)。麴菌の $\alpha$ -アミラーゼは pH 4 以下で活性が著しく低下することが報告されており (Kundu and Das, 1970)、さらにマイクロアレイ解析の結果から酸性プロテアーゼ遺伝子の発現量が $\Delta creA$  では野生株よりも上昇していたことから (data not shown)、 $\Delta creA$  では pH の低下に伴い $\alpha$ -アミラーゼが変性し、変性した $\alpha$ -アミラーゼがプロテアーゼによって分解されたことが示唆された。

$\Delta creA$  において pH が急激に低下する原因を特定するために培養上清中の有機酸量を解析した結果、ピルビン酸が多量に生産されており、野生株と比較して約 3 倍増加していた (Fig. 3-4)。このことから培養上清中のピルビン酸量が増加したことで pH が低下したことが示唆された。そこで、ピルビン酸の生産量が増加した要因を特定するためにマイクロアレイ解析を行なった結果、 $\Delta creA$  では有機酸生合成やアミノ酸の代謝及び分解、糖新生に関与する遺伝子の発現が上昇しており、野生株よりも TCA 回路が活性化していることが示唆された (Fig. 3-5)。ピルビン酸は解糖系を経て生合成されるため、解糖系酵素遺伝子の発現が増加したことでピルビン酸量が増加したと予想していたものの、予想に反して $\Delta creA$  では解糖系酵素遺伝子の *enoA* や *pfkB* の発現量が野生株よりも低下していた。そこで、 $\Delta creA$  のピルビン酸高生産に関与する因子として Phosphoenolpyruvate carboxykinase (AcuF) に着目した。AcuF は糖新生反応において TCA 回路内で生産されたオキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸に変換する酵素であり、野生株においても高い発現量を示す。 $\Delta creA$  において *acuF* の発現量が野生株よりも約 15 倍増加していたことから、 $\Delta creA$  では活性化した TCA 回路内で合成されたオキサロ酢酸が AcuF によってホスホエノールピルビン酸へ次々と変換され、その結果多量に合成されたホスホエノールピルビン酸がピルビン酸に変換されたことで、培養上清中のピ

ルビン酸量が増加したのではないかと予想した。しかし、予想に反して $\Delta creA \Delta acuF$  は  $\Delta creA$  と同様に pH が低下したことから、 $AcuF$  の高発現は $\Delta creA$  のピルビン酸生産量の増加には関与しないことが示唆された (Fig. 3-6)。 $AcuF$  以外の因子として、マイクロアレイ解析の結果からピルビン酸をアセトアルデヒドへ変換する酵素 Pyruvate decarboxylase (AO090003000661) の発現量が $\Delta creA$  において低下していることから、今後は $\Delta creA$  で AO090003000661 を高発現させることで培養上清の pH が変化するか解析する予定である。

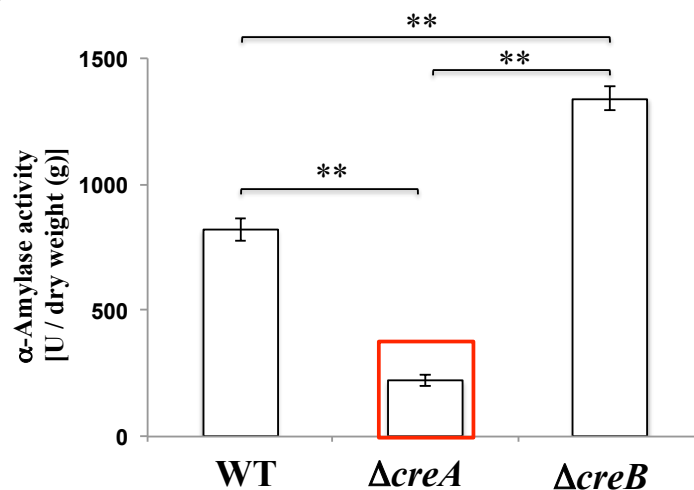
YP 培地とは異なり最小培地においてピルビン酸を含む有機酸の生産が誘導された原因として、培地中の窒素源の違いが考えられた。そこで、最小培地中の窒素源を変化させた結果、 $\Delta creA$  は 0.1% ポリペプトン培地と同様に 0.1% カザミノ酸培地においても pH が低下したのに対し、無機窒素の硝酸ナトリウム培地では pH が低下しなかった (Fig. 3-6)。 $\Delta creA$  において急激な pH の低下が観察されたカザミノ酸培地とポリペプトン培地は共にアミノ酸を含んでおりさらに、 $\Delta creA$  ではアミノ酸の分解及び代謝に関与する 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (AO090003000208) や D-aspartate oxidase (AO090113000084) の発現量が増加していたことから、 $\Delta creA$  における pH の低下にはアミノ酸が関与していることが予想された。そこで、各種アミノ酸を単一窒素源とした培地における pH の変化を解析した結果、ロイシンやフェニルアラニン培地において pH の低下が観察された。以上の結果から、 $\Delta creA$  は培地中のアミノ酸に応答して有機酸生産を誘導することが示唆された。これまでに *A. nidulans* において、ロイシンの代謝に関与する *hlyA* はロイシンによって発現が誘導されるものの、ロイシンとグルコースの混合培地ではその発現が著しく抑制され、同様にフェニルアラニンの代謝に関与する *maiA* もフェニルアラニンとグルコースの混合培地において発現が強く抑制されることが明らかになっている (Rodríguez *et al.*, 2004; Fernández-Cañón and Peñalva., 1998)。さらに、 $\Delta creA$  では *hlyA* 及び *maiA* のオーソログである AO090038000541 と AO0900030000212 の発現量が野生株よりも増加していたことから、アミノ酸代謝分解に関与する遺伝子は CreA による CCR を受けることが示唆された (Table 3-3)。さらに糸状菌 *Neurospora crassa* は、炭素源飢餓条件においてアミノ酸代謝に関与するタンパク質量を増加させることから、CreA は炭素源が豊富な条件ではアミノ酸代謝分解に関与する遺伝子の発現を抑制し、一方炭素源飢餓条件においてその抑制を解除することでアミノ酸代謝を促進

させる可能性が考えられた (Xiong *et al.*, 2014)。

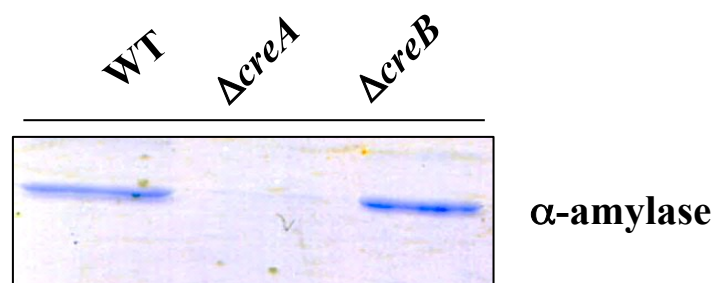
また本章におけるマイクロアレイ解析の結果、 $\Delta creA$  において野生株よりも発現量が低下する遺伝子が見出された。CreA は一般的に遺伝子の発現抑制因子として機能することが知られており (Bailey and Arst, 1975)、これまでに遺伝子の発現誘導因子として CreA が機能するという報告はほとんどない。これまでに *A. nidulans* において CreA の相互作用因子として、多くの因子が同定されている (Alam and Kelly, 2017)。さらに本研究室の田中により、CreA はリン酸化されている可能性が見出されたことから (data not shown)、CreA は相互作用する因子や修飾状態の変化によって遺伝子の発現を誘導または抑制にシフトすることが予想された。そこで今後は、炭素源枯渇条件を含めた多様な培養条件における CreA の制御下遺伝子を同定すると同時に、CreA の相互作用因子や修飾状態を解析することで、CreA による遺伝子発現制御機構についてより理解を深めていきたい。

3-5) 図表

(A)



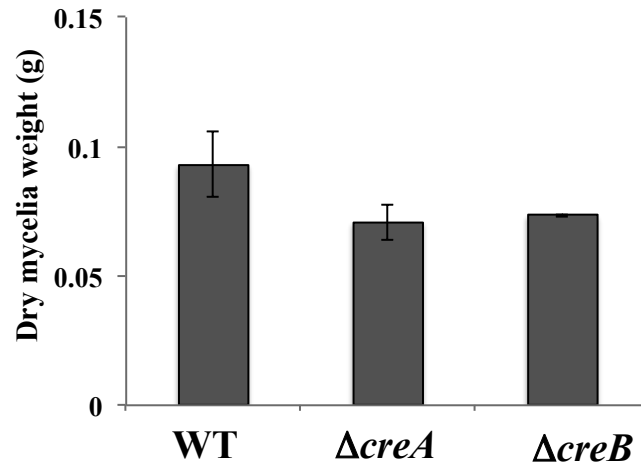
(B)



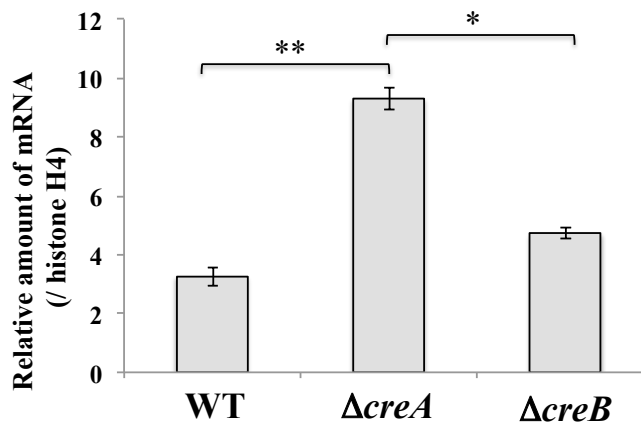
**Fig. 3-1 α-Amylase production level.**

Each strain was grown in Czapek-Dox medium containing 0.1% polypeptone and 1% maltose for 24 h. α-Amylase activity was measured and total activity was divided by dry mycelia weight (A), and culture broth and cell wall-absorbed fraction were mixed and subjected to SDS-PAGE analysis (B). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\*\* $p < 0.01$ ; Tukey-Kramer method)

(A)



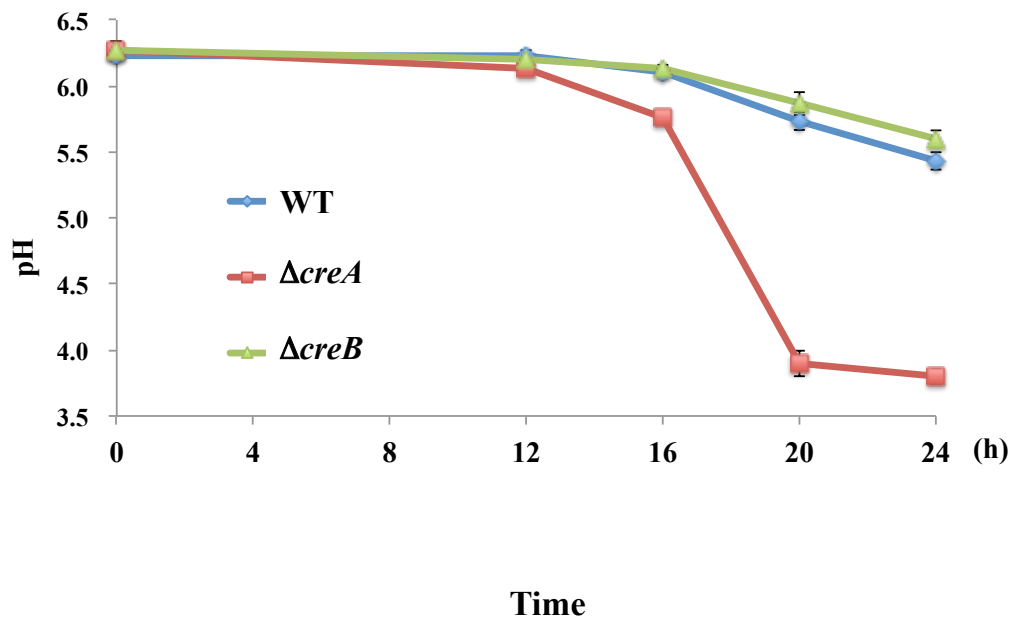
(B)



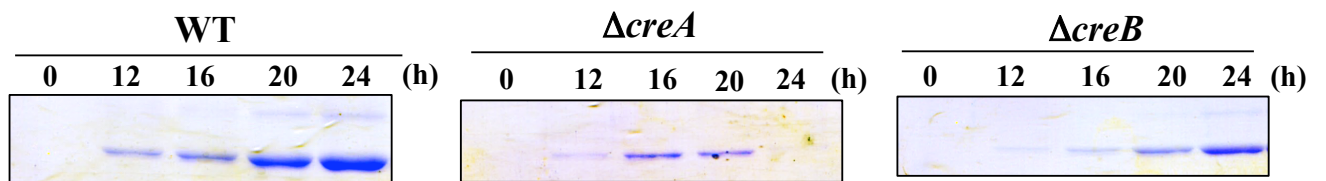
**Fig. 3-2 Growth and Expression level of  $\alpha$ -amylase gene.**

Each strain was grown in Czapek-Dox medium containing 0.1% polypeptone and 1% maltose for 24 h and dry mycelia weight was measured (A). Expression level of *amyB* was measured by quantitative RT-PCR. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01; Tukey-Kramer method)

(A)



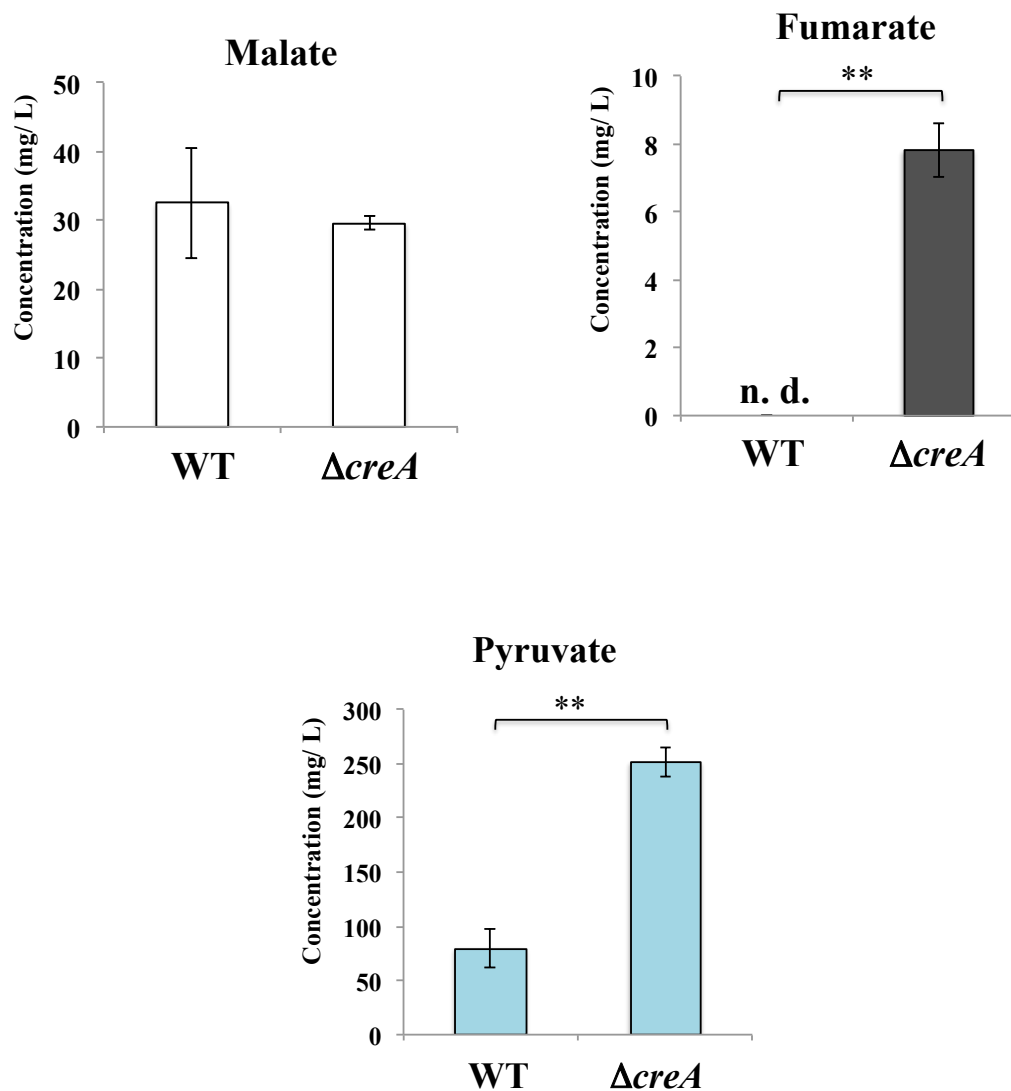
(B)



**Fig. 3-3 pH of culture broth.**

Each strain was grown in Czapek-Dox medium containing 0.1% polypeptone and 1% maltose for 24 h, and pH of culture broth was measured (A). Culture broth was subjected to SDS-PAGE analysis and production level of  $\alpha$ -amylase was observed (B). The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars.





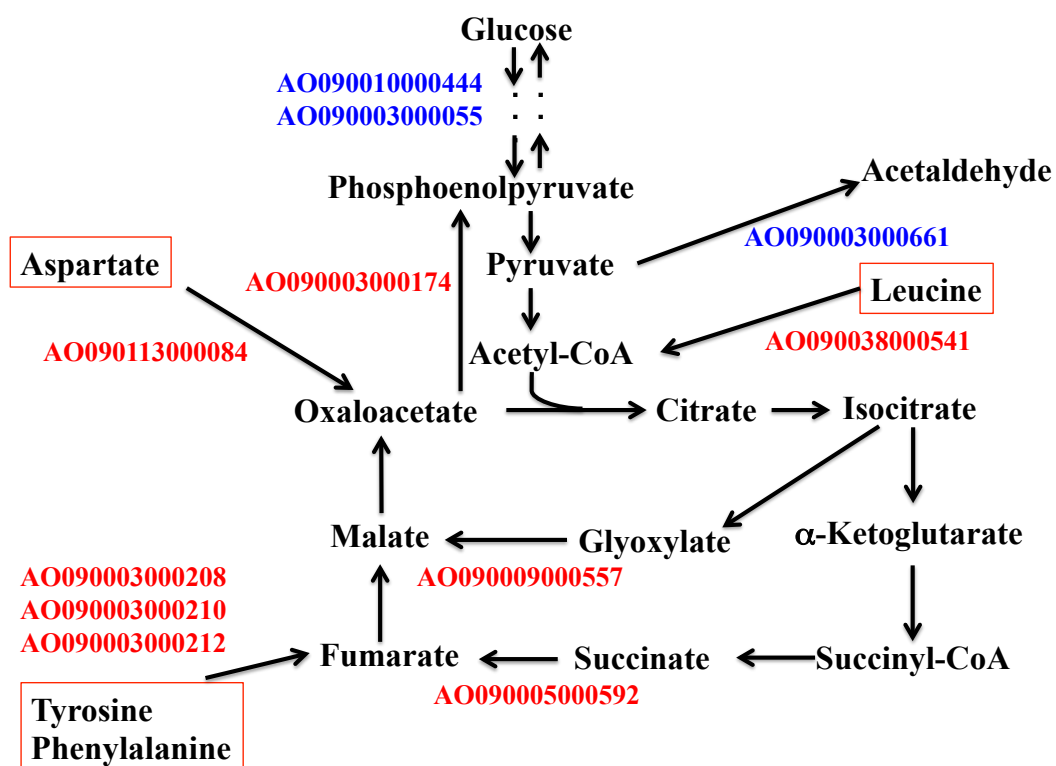
**Fig. 3-4 Organic acid production level.**

Each strain was grown in Czapek-Dox medium containing 0.1% polypeptone and 1% maltose (pH 6.5) for 24 h, and the amount of each organic acid (malate, fumarate and pyruvate) was measured. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars. (\*\* $p < 0.01$ ; Student's t test)

Gene	Protein	$\Delta creA$ / WT ratio
AO090003000661	Pyruvate decarboxylase ( <i>A. nidulans pdcA</i> )	0.12
AO090010000444	Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase ( <i>pfkB</i> )	0.23
AO090003000055	Enolase ( <i>enoA</i> )	0.48
AO090005001404	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase ( <i>A. nidulans idpA</i> )	1.8
AO090009000557	Malate synthase ( <i>A. nidulans acuE</i> )	3.6
AO090113000084	D-aspartate oxidase	5.0
AO090005000592	Fumarate reductase	5.5
AO090038000541	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase/ 3 methylglutaconyl coenzyme A hydratase ( <i>A. nidulans hlyA</i> )	6.1
AO090003000208	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase ( <i>A. nidulans hpdA</i> )	7.6
AO090003001367	Predicted oxidoreductase activity	12.0
AO090003000210	Homogentisate 1,2-dioxygenase ( <i>A. nidulans hmgA</i> )	12.8
AO090003000174	Phosphoenolpyruvate carboxykinase ( <i>A. nidulans acuF</i> )	15.3
AO090011000238	Amino acid transporters	17.9
AO090701000526	Predicted oxidoreductase activity	18.0
AO090003000212	Glutathione S-transferase ( <i>A. nidulans maiA</i> )	23.6

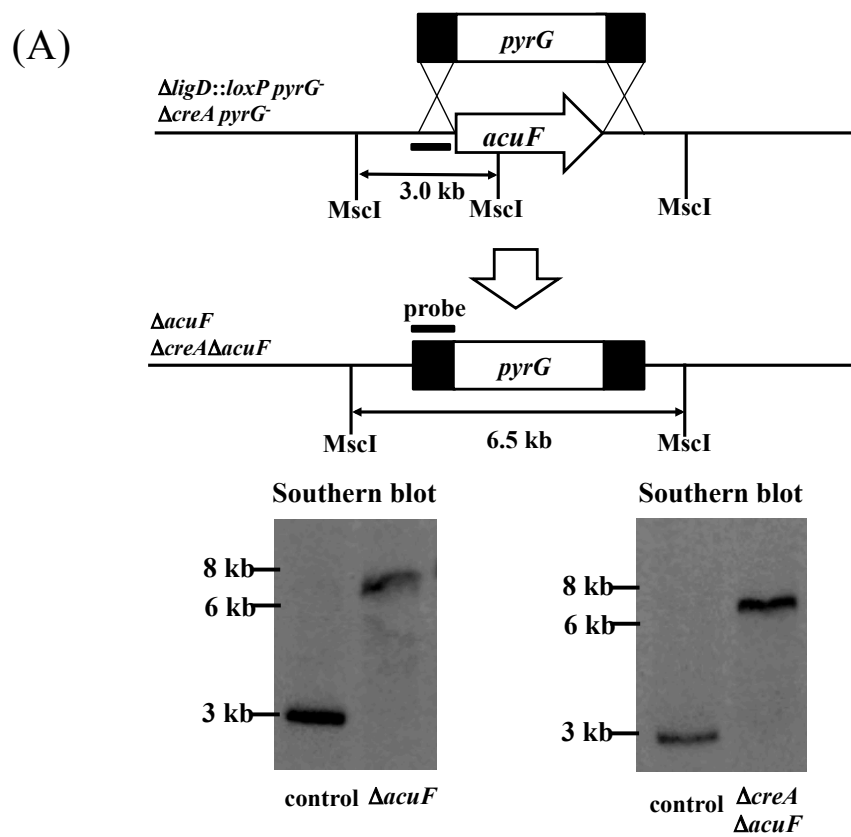
**Table 3-3 Microarray analysis.**

Wild-type and  $\Delta creA$  strains were grown in Czapek-Dox medium containing 0.1% polypeptone and 1% maltose (pH 6.5) for 24 h.



**Fig. 3-5 Effect of *creA* deletion on expression level of metabolic-related genes.**

Red letter: up-regulation, blue letter: down-regulation.

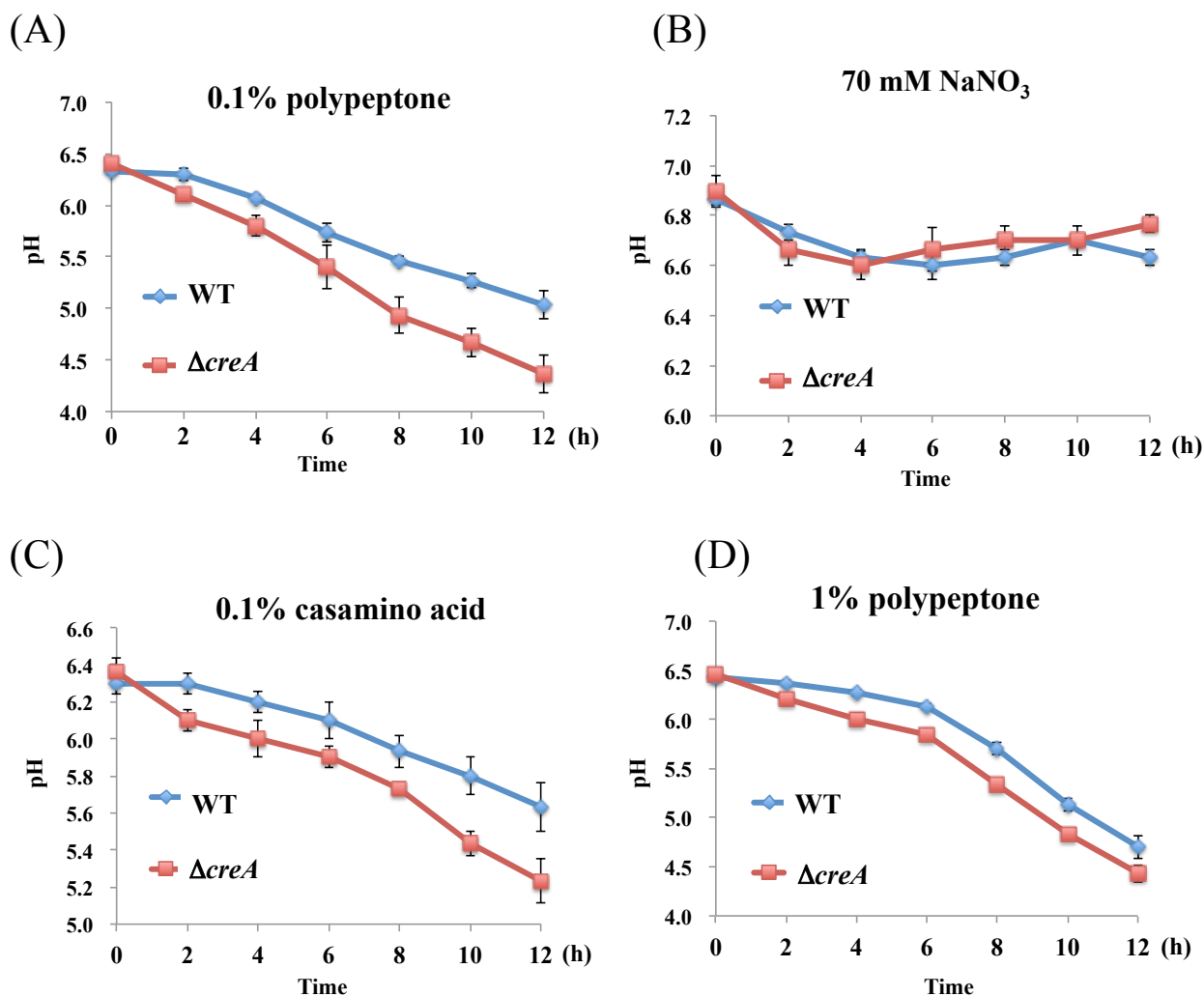
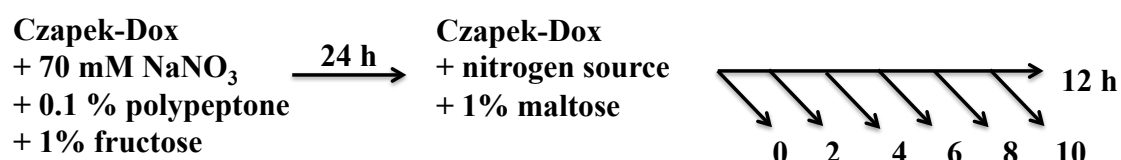


(B)

Strain	pH
WT	5.1 ( $\pm 0.1$ )
$\Delta creA$	3.6 ( $\pm 0.0$ )
$\Delta acuF$	4.9 ( $\pm 0.1$ )
$\Delta creA \Delta acuF$	3.5 ( $\pm 0.1$ )

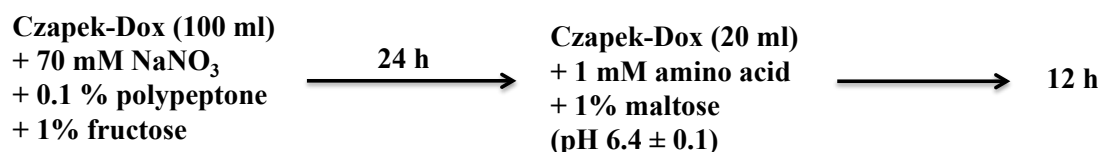
**Fig. 3-6 Construction of *acuF* deletion strains and pH of culture broth in *acuF* deletion strains.**

Scheme and confirmation of *acuF* gene deletion strains (A). Each strains was grown in Czapek-Dox medium containing 0.1% polypeptone and 1% maltose (pH 6.5) for 24 h and pH of culture broth was measured (B).



**Fig. 3-7 Effect of various nitrogen sources on pH of culture broth.**

Each strain was grown in Czapek-Dox medium containing 70 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.1% polypeptone and 1% fructose (pH 6.5) for 24 h, followed by transfer to Czapek-Dox medium containing each nitrogen source and 1% maltose, and pH of culture broth were measured at each time point. The values represent the means of triplicate experiments with standard deviation indicated by error bars.



	–	polypeptone	NaNO <sub>3</sub>	Gly	Ala	Val	Leu
<b>WT</b>	6.0 ± 0.0	4.6 ± 0.2	6.9 ± 0.0	6.0 ± 0.0	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.0	5.3 ± 0.1
<b><i>ΔcreA</i></b>	6.1 ± 0.0	3.9 ± 0.0	6.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.6 ± 0.1

	Ile	Ser	Thr	Phe	Trp	Cys	Met
<b>WT</b>	5.7 ± 0	6.0 ± 0.0	5.9 ± 0.0	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.1	6.1 ± 0.0	5.5 ± 0.1
<b><i>ΔcreA</i></b>	5.6 ± 0.0	6.0 ± 0.0	5.8 ± 0.0	5.3 ± 0.1	5.2 ± 0.0	5.6 ± 0.2	5.2 ± 0.1

	Pro	Asn	Gln	Asp	Glu	Arg	His
<b>WT</b>	5.9 ± 0.1	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.0	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.1	6.2 ± 0.1
<b><i>ΔcreA</i></b>	5.7 ± 0.0	5.7 ± 0.0	5.6 ± 0.0	5.8 ± 0.0	5.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.8 ± 0.0

**Table. 3-4 Effect of various amino acid on pH of culture broth.**

Each strain was grown in Czapek-Dox medium containing 70 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.1% polypeptone and 1% fructose (pH 6.5) for 24 h, followed by transfer to Czapek-Dox medium containing 1 mM each amino acid and 1% maltose. Mycelia were incubated for 12 h and pH of culture broth were measured.

## 総合考察

本博士論文では、産業において有用な物質を高生産する麹菌株を造成するために CCR 関連因子である CreA 及び CreB に着目して研究を行なった。

*A. nidulans* や *T. reesei* において *creA* 変異株と *creB* 変異株では CCR が解除されることが報告されており、麹菌の  $\Delta creA$  及び  $\Delta creB$  においても CCR が解除され、さらに興味深いことに  $\Delta creA\Delta creB$  は  $\Delta creA$  及び  $\Delta creB$  と比較して  $\alpha$ -アミラーゼ、キシラナーゼ及び  $\beta$ -グルコシダーゼの生産性が顕著に増加することが観察された (Fig. 1-1)。これまでに *A. nidulans* の CreA はユビキチン化及び脱ユビキチン化によって制御され、ユビキチン化された CreA は CreB によって脱ユビキチン化されることで CCR が誘導されると予想されていたため、*creA* 破壊株において *creB* を破壊しても *creA* 単独破壊株と同じ効果を示すと考えられていた。しかし、本研究において  $\Delta creA\Delta creB$  は  $\Delta creA$  以上の酵素生産性を示し、さらに近年の研究では CreA のユビキチン化は観察されず、CreA 及び CreB 間の相互作用も認められていない (Alam *et al.*, 2017)。以上のことからこれまでの予想モデルとは異なり、CCR の制御において CreA と CreB はそれぞれ異なる因子の制御を行っている可能性が考えられた。そこで、 $\Delta creA\Delta creB$  の酵素高生産化に CreA と CreB の制御下因子がどのように関与しているのかを本研究で得られた結果から考察した。

まず、*creA* 破壊が酵素生産に及ぼす影響を考える。CreA は CCR を制御する広域制御型転写因子であり、CCR が誘導される条件において様々な遺伝子の発現を抑制することが知られている。そのため *creA* を破壊すると多くの遺伝子の発現が増加し、その中で多糖類分解酵素遺伝子の発現量が野生株よりも著しく増加することが第 1 章において観察された。さらに CreA は多糖類分解酵素遺伝子に加えて、細胞壁構成多糖である  $\alpha$ -グルカンの合成及び分解に関与する AgsB 及び AmyD の発現制御に関与することが第 2 章において明らかになった。AmyD は  $\alpha$ -グルカンの分解に関与しており、 $\Delta creA$  では *amyD* の発現量の増加によって  $\alpha$ -グルカンの分解が促進し、その結果液体培養時には菌糸形態がパルプ状に変化した。パルプ状への菌糸形態の変化は液体培養における菌体量の増加に効果があることが知られており、実際に  $\Delta creA$  は野生株よりも菌体量が増加した。以上のことから、*creA* 破壊は多様な多糖類分解酵素遺伝子の高発現及び液体培養時の菌体量の増加に効果があり、液体培地における酵素高生産化に非常に有効な変異で

あることが示唆された。しかし、培地によって $\Delta creA$ の酵素生産性が著しく悪化することが第3章の結果から明らかになった。そのため、酵素生産に $\Delta creA$ を用いる場合は培養条件の最適化や酵素生産性の低下を引き起こす因子の排除が必要であると考えられる。

次に  $creB$  破壊の酵素高生産への効果を考える。 $\Delta creB$  は $\Delta creA$ と同様に野生株よりも $\alpha$ -アミラーゼ活性が高いものの、 $\Delta creA$ とは異なり $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現量は野生株よりもわずかに増加しただけだった。(Fig. 1-1)。このことから、 $\alpha$ -アミラーゼ生産制御において  $CreB$  は転写ではなく転写後の制御に関与することが示唆された。そこで、 $CreB$  がどのような因子の制御に関与しているのか明らかにするために、タンデムアフィニティー精製法を用いて  $CreB$  の相互作用因子の同定を目指したものの、本博士論文研究では達成することができなかった。

しかし、これまでの研究から $\Delta creB$ において興味深い現象が観察されている。麹菌のマルトーストランスポーターMalPはグルコースに応答して分解されるものの、 $\Delta creB$ ではグルコース非存在条件下においても分解が誘導されることが観察された (data not shown)。MalPの分解にはアレスチン様タンパク質  $CreD$  と HECT ユビキチンリガーゼ  $HulA$  が関与しており、グルコース存在条件下において MalP は  $CreD$  及び  $HulA$  の複合体によってユビキチン化されて分解される (Hiramoto *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2017)。このことから、 $CreB$  は MalP の脱ユビキチン化に関与し、 $CreB$  欠損条件下では MalP の脱ユビキチン化が行われないことで MalP の分解が進行することが示唆された。さらに、 $\Delta creB$ は液体培養時に菌糸形態は変化しないものの、細胞壁中の $\alpha$ -グルカン量が野生株よりも減少した (data not shown)。*A. nidulans* において $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素  $AgsB$  はユビキチン化されることが報告されており、 $CreB$  はユビキチン化された  $AgsB$  の脱ユビキチン化に関与する可能性が考えられた (Chu *et al.*, 2016)。そこで今後は、 $\Delta creB$ における MalP 及び  $AgsB$  のユビキチン化度を解析することで、 $CreB$  がこれらの因子の脱ユビキチン化に関与しているか明らかにしていきたい。また 0.1%ポリペプトン培地において経時的に pH を測定すると、 $\Delta creA$ と同様に野生株も pH が時間経過にしたいがい低下することが第3章において観察されたのに対して、 $\Delta creB$ は pH がほとんど低下しなかった。さらに、興味深いことに $\Delta creA\Delta creB$ は $\Delta creB$ と同様に pH が低下しなかったことから、有機酸生産において  $CreB$  は  $CreA$  のサプレッサーとして機能すること



が示唆された。 $\Delta creA$  における pH の低下にはアミノ酸が関与していることから、CreB はアミノ酸資化に関与する因子の制御も行なっている可能性が考えられた。以上の結果から、CreB は多様な因子の脱ユビキチン化に関与することが示唆されたものの、これらの因子が $\Delta creB$  の酵素生産性の向上にどのように関与するかは未だに不明である。そこで今後は CreB の制御下因子を同定することで、CreB による CCR 及び酵素生産の制御機構を明らかにする必要があると考えられる。

本博士論文研究を通じて、麹菌の CreA 及び CreB は多種多様な因子の制御に関与し、さらに *creA* 及び *creB* の二重破壊は酵素高生産化に非常に効果があることが明らかになった。今後は CreA と CreB の機能をより詳細に解析することで麹菌における CCR 制御機構を解明し、自己タンパク質に加えて異種タンパク質の高生産が可能な $\Delta creA \Delta creB$  を超える有用物質高生産性麹菌株の造成が期待される。

## 原著論文

Ichinose S., Tanaka M., Shintani T., and Gomi K. (2014) Improved  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(1): 335-343.

Ichinose S., Tanaka M., Shintani T., and Gomi K. (2018) Increased production of biomass-degrading enzymes by double deletion of *creA* and *creB* genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 125(2): 141-147.

## 参考文献

- Alam MA, Kelly JM. (2017) Proteins interacting with CreA and CreB in the carbon catabolite repression network in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 63(4):669-683.
- Alam MA, Kamlangdee N, Kelly JM. (2017) The CreB deubiquitinating enzyme does not directly target the CreA repressor protein in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 63(4):647-667.
- Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. (1992) On the safety of *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 36(5):569–572.
- Bailey C, Arst HN Jr. (1975) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem*. 51(2):573-577.
- Choma A, Wiater A, Komaniecka I, Paduch R, Pleszczyńska M, Szczodrak J. (2013) Chemical characterization of a water insoluble (1→3)- $\alpha$ -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydr Polym*. 91(2):603-8.
- Chu XL, Feng MG, Ying SH. (2016) Qualitative ubiquitome unveils the potential significances of protein lysine ubiquitination in hyphal growth of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*. 62(1):191-201.
- De Assis LJ, Ries LN, Savoldi M, Dos Reis TF, Brown NA, Goldman GH (2015) *Aspergillus nidulans* protein kinase A play an important role in cellulose production. *Biotechnol Biofuels*. 8:213
- Denton JA, Kelly JM (2011) Disruption of *Trichoderma reesei cre2*, encoding an ubiquitin C-terminal hydrolase, results in increased cellulose activity. *BMC Biotechnol*. 11:103

De Vit MJ, Johnston M. (1999) The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol*. 9(21):1231–41.

De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell*. 8(8):1603–18.

Dichtl K, Samantaray S, Aimaganianda V, Zhu Z, Prévost MC, Latgé JP, Ebel F, Wagener J. (2015) *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall  $\beta$ -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Mol Microbiol*. 95(3):458-71.

Dowzer CE, Kelly JM. (1991) Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*. 11(11):5701–9.

Emri T, Molnár Z, Veres T, Pusztahelyi T, Dudás G, Pócsi I. (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emmericella nidulans*. *Mycol Res*. 110(Pt 10):1172-8.

Fernández-Cañón JM, Peñalva MA. (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J Biol Chem*. 273(1):329-37.

Fontaine T, Beauvais A, Loussert C, Thevenard B, Fulgsang CC, Ohno N, Clavaud C, Prevost MC, Latgé JP. (2010) Cell wall alpha1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 47(8):707-12.

Fukuda K, Yamada K, Deoka K, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. (2009) Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot Cell*. 8(7):945-56.

Gomi K, Akeno T, Minetoki T, Ozeki K, Kumagai C, Okazaki N, Iimura Y. (2000) Molecular

cloning and characterization of a transcriptional activator gene, *amyR*, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 64(4):816-27.

Gomi K, Iimura Y, Hara S (1987) Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric Biol Chem*. 51:2549–2555

Hanahan D.(1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166(4):557–580

Hata Y, Ishida H, Ichikawa E, Kawato A, Suginami K, Imayasu S (1998) Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene*. 207:127–134

He X, Li S, Kaminskyj SG. (2014) Characterization of *Aspergillus nidulans*  $\alpha$ -glucan synthesis: roles for two synthases and two amylases. *Mol Microbiol*. 91(3):579-95.

He X, Li S, Kaminskyj S. (2017) An Amylase-Like Protein, AmyD, Is the Major Negative Regulator for  $\alpha$ -Glucan Synthesis in *Aspergillus nidulans* during the Asexual Life Cycle. *Int J Mol Sci*. 18(4). pii: E695.

Hiramoto T, Tanaka M, Ichikawa T, Matsuura Y, Hasegawa-Shiro S, Shintani T, Gomi K. (2015) Endocytosis of a maltose permease is induced when amylolytic enzyme production is repressed in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol*. 82:136-44.

Hoang HD, Maruyama J, Kitamoto K. (2015) Modulating endoplasmic reticulum-Golgi cargo receptors for improving secretion of carrier-fused heterologous proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol*. 81(2):533-43.

Hynes MJ, Kelly JM. (1977) Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon

metabolism. *Mol Gen Genet.* 150(2):193–204.

Ichinose S, Tanaka M, Shintani T, Gomi K. (2014) Improved  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98(1):335–43.

Kanemori Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Tamura G. (1999) Insertion analysis of putative functional elements in the promoter region of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A gene (*amyB*) using a heterologous *Aspergillus nidulans* amdS-lacZ fusion gene system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(1):180-3.

Karaffa L, Sándor E, Fekete E, Szentirmai A. (2001) The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 48(3-4):429-40.

Kato M, Sekine K, Tsukagoshi N. (1996) Sequence-specific binding sites in the Taka-amylase A G2 promoter for the CreA repressor mediating carbon catabolite repression. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60(11):1776–9.

Knuf C, Nookaew I, Brown SH, McCulloch M, Berry A, Nielsen J. (2013) Investigation of malic acid production in *Aspergillus oryzae* under nitrogen starvation conditions. *Appl Environ Microbiol.* 79(19):6050-8

Kundu AK, Das S. (1970) Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol.* 19(4):598-603.

Lockington RA, Kelly JM. (2001) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Mol Microbiol.* 40(6):1311–21.

Lockington RA, Kelly JM. (2002) The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes

the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 43(5):1173–82.

Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu J, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, Yamada O, Yamagata Y, Anazawa H, Hata Y, Koide Y, Komori T, Koyama Y, Minetoki T, Suharnan S, Tanaka A, Isono K, Kuhara S, Ogasawara N, Kikuchi H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*.22;438(7071):1157–61.

Minetoki T, Kumagai C, Gomi K, Kitamoto K, Takahashi K. (1998) Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50(4):459-67.

Miyazawa K, Yoshimi A, Zhang S, Sano M, Nakayama M, Gomi K, Abe K. (2016) Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthase. *J Biosci Bioeng.* 124(1):47-53.

Nakamura T, Maeda Y, Tanoue N, Makita T, Kato M, Kobayashi T. (2006) Expression profile of amylolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(10):2363-70.

Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, Vehmaanperä J, Penttilä M, Saloheimo M. (2009) Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved

protein production. *Appl Environ Microbiol.* 75(14):4853–60.

Natasha A. Boase and Joan M. Kelly. (2004) A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Molecular Microbiology.* 53 (3), 929–940

Nitsche BM, Jørgensen TR, Akeroyd M, Meyer V, Ram AF. (2012) The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics.* 13:380.

Noguchi Y, Sano M, Kanamaru K, Takeuchi M, Kato M, Kobayashi T (2009) Genes regulated by AoXlnR, the xykanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:141-154

Obata H, Ishida H, Hata Y, Kawato A, Abe Y, Akao T, Akita O, Ichishima E (2004) Cloning of a novel tyrosinase-encoding gene (*melB*) from *Aspergillus oryzae* and its overexpression in solid-state culture (Rice Koji). *J Biosci Bioeng.* 97:400–405

Rodríguez JM, Ruíz-Sala P, Ugarte M, Peñalva MA. (2004) Fungal metabolic model for type I 3-methylglutaconic aciduria. *J Biol Chem.* 279(31):32385-92.

Ruijter GJ, Visser J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett.* 151(2):103-14.

Sato H, Toyoshima Y, Shintani T, Gomi K (2011) Identification of potential cell wall component that allows Tala-amylase A adsorption in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92:961-969

Schuster A, Tisch D, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Schmoll M (2012) Roles of protein kinase A and adenylate cyclase in light modulated cellulose regulation in *Trichoderma reesei*. *Appl*

Suzuki K, Tanaka M, Konno Y, Ichikawa T, Ichinose S, Hasegawa-Shiro S, Shintani T, Gomi K. (2015) Distinct mechanism of activation of two transcription factors, AmyR and MalR, involved in amylolytic enzyme production in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(4):1805-15.

Tada S, Iimura Y, Gomi K, Takahashi K, Hara S, Yoshizawa K (1989) Cloning and nucleotide sequence of the genomic Taka-amylase A gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric Biol Chem.* 53:593–599

Tamano K, Sano M, Yamane N, Terabayashi Y, Toda T, Sunagawa M, Koike H, Hatamoto O, Umitsuki G, Takahashi T, Koyama Y, Asai R, Abe K, Machida M (2008) Transcriptional regulation of genes on the non-syntenic blocks of *Aspergillus oryzae* and its functional relationship to solid-state cultivation. *Fungal Genet Biol.* 45:139–151.

Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M. (2008) CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 45(6):984-93.

Tanaka M, Tokuoka M, Gomi K. (2014) Effects of codon optimization on the mRNA levels of heterologous genes in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98(9):3859-67.

Tanaka M, Hiramoto T, Tada H, Shintani T, Gomi K. (2017) Improved  $\alpha$ -Amylase Production by Dephosphorylation Mutation of CreD, an Arrestin-Like Protein Required for Glucose-Induced Endocytosis of Maltose Permease and Carbon Catabolite Derepression in *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 83(13). pii: e00592-17.

Tonomura K, Suzuki H, Nakamura N, Kuraya K, Tanabe O (1961) On the inducers of



$\alpha$ -amylase formation in *Aspergillus oryzae*. *Agric Biol Chem*. 25:1–6

Trumbly RJ. (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 6(1):15-21.

Tsuchiya K, Tada S, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Jigami Y, Tamura G. (1992) High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 38(1):109-14.

van der Kaaij RM, Yuan XL, Franken A, Ram AF, Punt PJ, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. (2007) Two novel, putatively cell wall-associated and glycosylphosphatidylinositol-anchored  $\alpha$ -glucanotransferase enzymes of *Aspergillus niger*. *Eukaryot Cell*. 6(7):1178-88.

Viniegra-González G, Favela-Torres E (2006) Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technol Biotechnol*. 44:397–406.

Xiong Y, Coradetti ST, Li X, Gritsenko MA, Clauss T, Petyuk V, Camp D, Smith R, Cate JHD, Yang F, Glass NL. (2014) The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. *Fungal Genet Biol*. 72:21-33.

Yoshimi A, Sano M, Inaba A, Kokubun Y, Fujioka T, Mizutani O, Hagiwara D, Fujikawa T, Nishimura M, Yano S, Kasahara S, Shimizu K, Yamaguchi M, Kawakami K, Abe K. (2013) Functional analysis of the  $\alpha$ -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: *agsB* is the major  $\alpha$ -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One*. 8(1):e54893

Zhang S, Sato H, Ichinose S, Tanaka M, Miyazawa K, Yoshimi A, Abe K, Shintani T, Gomi K. (2017) Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan prevents  $\alpha$ -amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng*. 124(1):47-53.

小川真弘、國武絵美、小林哲夫、小山泰二 (2015) 麹菌 *Aspergillus oryzae* のタンパク質リン酸化酵素 PkaA は糖質加水分解酵素のカーボ ンカタボライト抑制に関与する、日本農芸化学会 2015 年度大会

張斯来、田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也 (2015) 麹菌細胞壁の $\alpha$ -1,3-グルカンは液体培養におけるタカアミラーゼの細胞壁吸着性に関与する、第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス

## 謝辞

本博士論文を作成するにあたり、ご指導、ご教示賜りました東北大学大学院農学研究科 遺伝子情報システム学分野教授 五味 勝也 博士、准教授 新谷 尚弘 博士、助教授 渡部 昭 博士に感謝申し上げます。

本博士論文の副査を引き受けていただきました、東北大学大学院農学研究科 応用微生物学分野教授 阿部 敬悦 博士、動物微生物学分野准教授 米山 裕 博士に厚く御礼申し上げます。

本博士論文における細胞壁構成多糖の成分解析でご指導、ご協力をいただきました、東北大学 吉見 啓 博士、東北大学大学院農学研究科 宮澤 拳 氏に御礼申し上げます。

本博士論文における培地中の有機酸の定量解析でご協力いただきました、酒類総合研究所 山田 修 博士、琉球大学准教授 水谷 治 博士に心より感謝申し上げます。

研究に関して様々なご助言を賜りました、静岡県立大学食品栄養科学部 生物分子工学研究室助教授 田中 瑞己 博士に厚く御礼申し上げます。